

**VNIVERSIDAD D SALAMANCA**

**FACVLTA D FARMACIA**

**DEPARTAMENTO D FISIOLGÍA Y FARMACOLOGÍA**

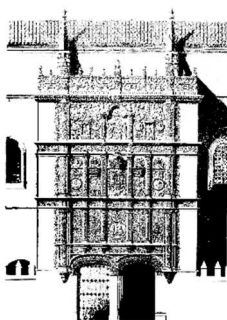


**TESIS DOCTORAL**

**EVALVACIÓN DEL EFECTO D LA ASTAXANTINA  
Y DEL LICOPENO SOBRE EL SÍNDROME  
METABÓLICO**

**RVBÉN APARICIO PEÑACOBÁ**

**2020**







FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca

**Dña. M<sup>a</sup> ÁNGELES SEVILLA TORAL, Dña. M<sup>a</sup> JOSÉ MONTERO GÓMEZ y Dña. ROSALÍA CARRÓN DE LA CALLE**, Profesoras de Farmacognosia y Farmacología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada **“Evaluación del efecto de la astaxantina y del licopeno sobre el síndrome metabólico”**, que presenta **D. Rubén Aparicio Peñacoba** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología (Departamento de Fisiología y Farmacología) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y, considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca, a veintitrés de octubre de dos mil veinte.



**D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN**, Director del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y **Dña. MARÍA JESÚS MONTE RÍO**, Directora del Programa de Doctorado en Fisiopatología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada **“Evaluación del efecto de la astaxantina y del licopeno sobre el síndrome metabólico”**, que presenta **D. Rubén Aparicio Peñacoba** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de las Dras. Dña. María Ángeles Sevilla Toral, María José Montero Gómez y Dña. Rosalía Carrón de la Calle en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca, a veintitrés de octubre de dos mil veinte.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. María Jesús Monte Río



Rubén Aparicio Peñacoba ha disfrutado de un contrato predoctoral de la Universidad de Salamanca cofinanciado por el Banco Santander durante la realización de este trabajo.





A mi familia

“El conocimiento avanza pasando de viejos problemas a problemas nuevos por medio de conjeturas y refutaciones”.

Objective Knowledge 7,1. Karl Popper



## AGRADECIMIENTOS

La realización de la tesis doctoral supone una etapa de formación profesional y enriquecimiento personal, que no sería posible sin la colaboración y apoyo de un gran número de personas. Quiero expresar mi agradecimiento a todas ellas.

A las Doctoras María Ángeles Sevilla, María José Montero y Rosalía Carrón, directoras de la tesis, que confiaron en mí para formar parte de su equipo de investigación y han hecho posible desarrollar este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Fisiología y Farmacología, especialmente del Área de Farmacología de Farmacia: a los Dres. Asunción Morán, Mónica García, José Ángel García, Marisa Martín, Luis San Román, Miriam Gómez, Sandra Sancho y Ana Vega Ortiz; a Emilia Flores, Anabel, Sergio, Bienve y Javier, a mis compañeros de laboratorio Eily, Lesly y Pedro, y a los estudiantes de Grado y Máster. Gracias por vuestro interés, apoyo y amistad a lo largo de estos años.

Al Servicio de Experimentación Animal, al Servicio de Patología Molecular Comparada, al Departamento de Nutrición y Bromatología y al Departamento de Ciencias Farmacéuticas, que han sido indispensables para la realización de este trabajo de investigación. No me quiero olvidar del resto de trabajadores de la Facultad de Farmacia, su buena disposición y profesionalidad han hecho más fácil mi trabajo diario.

A mi familia, gracias por vuestro esfuerzo, vuestro cariño y por estar siempre a mi lado.

A todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de mi vida y especialmente durante esta etapa. La lista es muy extensa y espero poder agradecer personalmente vuestra amistad.

Salamanca, 23 de octubre de 2020



## ABREVIATURAS

<b>5-HT:</b> serotonina	<b>GPx:</b> Glutación peroxidasa
<b>ABC:</b> Área bajo la curva	<b>GSK3:</b> Glucógeno sintasa kinasa 3
<b>ACh:</b> Acetilcolina	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> peróxido de hidrógeno
<b>ALT:</b> Alanina aminotransferasa	<b>HC:</b> Índice de hipertrofia cardíaca
<b>Ang II:</b> Angiotensina II	<b>HDL:</b> HDL-colesterol
<b>AST:</b> Aspartato aminotranferasa	<b>HR:</b> Índice de hipertrofia renal
<b>AXT:</b> Astaxantina	<b>HTA:</b> Hipertensión arterial
<b>CT:</b> Colesterol total	<b>IA:</b> Índice aterogénico
<b>DM:</b> Diabetes mellitus	<b>IDF:</b> Federación Internacional de Diabetes
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido	<b>IDL:</b> Lipoproteínas de densidad intermedia
<b>DPI:</b> difenil iodonium	<b>IGA:</b> Índice de grasa abdominal
<b>DPPH:</b> 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	<b>i.p.:</b> Vía intraperitoneal
<b>ECV:</b> Enfermedad cardiovascular	<b>JMAF:</b> Jarabe de maíz alto en fructosa
<b>EHGNA:</b> Enfermedad hepática grasa no alcohólica	<b>JNK:</b> cinasa c-jun terminal
<b>E<sub>max</sub>:</b> Efecto máximo	<b>IMC:</b> Índice de masa corporal
<b>ERN:</b> Especies reactivas de nitrógeno	<b>IRS:</b> Sustrato del receptor insulínico
<b>ERO:</b> Especies reactivas de oxígeno	<b>KPSS:</b> Solución hiperpotásica
<b>ERON:</b> Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno	<b>LDLc:</b> LDL-colesterol
<b>ET:</b> Equivalentes de Trolox	<b>L-NAME:</b> N(G) monometil-L-arginina
<b>FE:</b> Fenilefrina	<b>LIC:</b> Licopeno
<b>FRAP:</b> <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>	<b>LPL:</b> Lipoproteína lipasa
<b>FRCV:</b> Factores de riesgo cardiovascular	<b>MAPK:</b> Cinasas activadas por mitógenos

**mTOR:** diana de rapamicina en mamíferos

**NCEP-ATP III:** Programa Norteamericano para la Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos

**NO:** óxido nítrico

**NOSe:** óxido nítrico sintasa endotelial

**Noxs:** NAPH oxidasas

**Nrf2:** Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2

**NTP:** Nitroprusiato sódico

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** anión superóxido

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ONOO<sup>-</sup>:** Anión peroxinitrito

**PAS:** Presión arterial sistólica

**PI3K:** Fosfatidilinositol-3-cinasa

**PKC:** Proteína kinasa C

**PRx:** Peroxirredoxina

**SEA:** Servicio de Experimentación Animal

**SHR:** Ratas espontáneamente hipertensas

**SM:** Síndrome metabólico

**SMP:** Síndrome metabólico premórbido

**SOD:** Superóxido dismutasa

**SR-B1:** Receptor *scavenger* de clase B

**TG:** Triglicéridos

**URL:** Unidades relativas de luminiscencia

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad

**XO:** Xantina oxidasa

## ÍNDICE





<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Síndrome metabólico. Definición .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Epidemiología del síndrome metabólico .....</b>	<b>5</b>
2.1 Epidemiología de la obesidad .....	8
2.2 Epidemiología de la hiperglucemia y la diabetes.....	9
2.3 Epidemiología de la dislipemia .....	11
2.4 Epidemiología de la hipertensión .....	12
<b>3. Fisiopatología del síndrome metabólico.....</b>	<b>13</b>
3.1 Insulina.....	13
3.2 Lipoproteínas y transporte de lípidos .....	15
3.3 Obesidad, resistencia a la insulina e inflamación .....	17
<b>4. Etiología del síndrome metabólico .....</b>	<b>19</b>
4.1 Papel de la fructosa en el síndrome metabólico .....	21
4.2 Papel de la grasa en el síndrome metabólico .....	24
<b>5. Implicación del síndrome metabólico en enfermedades cardiovasculares y hepáticas.....</b>	<b>25</b>
<b>6. Estrés oxidativo en el síndrome metabólico .....</b>	<b>28</b>
5.1 Producción de ERON.....	30
5.2 Reducción del $\cdot\text{O}_2^-$ y formación de otras especies reactivas.....	31
5.3 El estrés oxidativo en la fisiopatología de la disfunción endotelial y del síndrome metabólico.....	32
5.4 Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo .....	34
<b>7. Tratamiento del síndrome metabólico .....</b>	<b>35</b>
<b>8. Carotenoides.....</b>	<b>36</b>
<b>9. Astaxantina .....</b>	<b>38</b>
<b>10. Licopeno.....</b>	<b>41</b>
<b>11. Acción antioxidante y antiinflamatoria de la astaxantina y del licopeno .....</b>	<b>42</b>
<b>12. Potencial terapéutico de la astaxantina y del licopeno.....</b>	<b>44</b>
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>SÍNDROME METABOLICO EN ANIMALES - METODOLOGÍA.....</b>	<b>51</b>
<b>1. Diseño experimental .....</b>	<b>53</b>
1.1 Síndrome metabólico en ratas.....	53
1.2 Síndrome metabólico en ratones .....	54
1.3 Tratamiento del síndrome metabólico en ratones.....	58
<b>2. Peso corporal y obesidad abdominal.....</b>	<b>59</b>
<b>3. Presión arterial.....</b>	<b>60</b>
<b>4. Hipertrofia cardíaca y renal .....</b>	<b>60</b>
<b>5. Tolerancia a la glucosa .....</b>	<b>61</b>
<b>6. Determinación del perfil lipídico en plasma .....</b>	<b>61</b>
<b>7. Análisis histológico del hígado.....</b>	<b>63</b>
<b>8. Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático .....</b>	<b>64</b>

9. Estudios de funcionalidad en arteria aorta de ratón .....	65
10. Expresión y análisis estadístico de los resultados.....	68
<b>SÍNDROME METABÓLICO EN ANIMALES – RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
<b>SÍNDROME METABÓLICO EN RATAS .....</b>	<b>71</b>
1. Peso corporal e índice de grasa abdominal .....	71
2. Presión arterial e hipertrofia cardíaca y renal .....	73
3. Tolerancia a la glucosa .....	74
4. Determinación del perfil lipídico en plasma.....	76
<b>PREVENCIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO EN RATONES .....</b>	<b>77</b>
1. Peso corporal e ingesta calórica.....	77
2. Obesidad abdominal.....	79
3. Presión arterial e hipertrofia cardíaca y renal .....	80
4. Tolerancia a la glucosa .....	81
5. Determinación del perfil lipídico en plasma.....	82
6. Morfometría e histología del hígado.....	86
7. Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático.....	87
8. Estudios de funcionalidad en arteria aorta .....	88
<b>TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO EN RATONES.....</b>	<b>93</b>
1. Peso corporal e ingesta calórica.....	95
2. Obesidad abdominal.....	97
3. Presión arterial e hipertrofia cardíaca y renal .....	98
4. Tolerancia a la glucosa .....	99
5. Determinación del perfil lipídico en plasma.....	101
6. Morfometría e histología del hígado.....	102
7. Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático.....	102
8. Estudios de funcionalidad en arteria aorta .....	105
<b>VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE – METODOLOGÍA .....</b>	<b>111</b>
<b>1. Modelos de disfunción endotelial en arteria aorta .....</b>	<b>113</b>
1.1 Disfunción endotelial inducida por pirogalol .....	114
1.2 Disfunción endotelial inducida por el sistema xantina/xantina oxidasa .....	115
1.3 Disfunción endotelial inducida por homocisteína .....	116
1.4 Expresión y análisis de los resultados.....	118
<b>2. Evaluación de la capacidad antioxidante .....</b>	<b>119</b>
2.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante quimioluminiscencia .....	119
2.2 Determinación directa de la capacidad antioxidante: ensayos DPPH y FRAP .....	120
<b>VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE - RESULTADOS .....</b>	<b>123</b>
1. Disfunción endotelial inducida por pirogalol .....	125
2. Disfunción endotelial inducida por el sistema xantina/xantina oxidasa.....	125

3. Disfunción endotelial inducida por homocisteína.....	126
4. Métodos directos de determinación de la capacidad antioxidante.....	127
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>165</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>191</b>
1. Disoluciones utilizadas.....	193
2. Sustancias utilizadas.....	194



## INTRODUCCIÓN



## 1. Síndrome metabólico. Definición

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por la coincidencia en un individuo de varios factores de riesgo cardiometabólico, entre los que habitualmente se considera la obesidad abdominal, la dislipemia, la elevación de la presión arterial y las alteraciones del metabolismo de la glucosa. La presencia de SM aumenta el riesgo de desarrollar diabetes mellitus (DM) y enfermedad cardiovascular (ECV)<sup>1</sup>. La relación entre ciertas alteraciones metabólicas y el riesgo de ECV se ha puesto de manifiesto desde hace décadas. En 1988, Gerald Reaven propuso el término *síndrome X* para describir dicha asociación, destacando el papel central de la resistencia insulínica en la fisiopatología<sup>2</sup>. En 1991, DeFronzo y Ferrannini emplearon *síndrome de insulinoresistencia* para referirse a la coexistencia de factores de riesgo metabólico y cardiovascular<sup>3</sup>.

Varias organizaciones han propuesto diferentes criterios para definir el SM (tabla 1). En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una definición basada en la presencia de resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, glucemia en ayunas alterada y/o DM tipo 2 y al menos dos de los siguientes criterios: obesidad abdominal, dislipemia, hipertensión y microalbuminuria<sup>4</sup>. En 1999, el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina estableció unos criterios similares a la OMS para caracterizar el SM pero no incluyó la microalbuminuria<sup>5</sup>. En 2001, el Programa Norteamericano para la Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (NCEP-ATP III) propuso una definición de SM basada en datos antropométricos y de laboratorio de fácil obtención, pero a diferencia de las anteriores definiciones no consideraba el binomio resistencia a la insulina/hiperinsulinemia<sup>6</sup>. En 2003, la Asociación Americana de Endocrinología Clínica consideró como criterio fundamental la resistencia a la insulina en ausencia de diabetes<sup>7</sup>. En 2005, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) propuso como requisito indispensable la obesidad abdominal y estableció puntos de corte según sexo y grupos étnicos<sup>8</sup>.

**Tabla 1.** Criterios para definir el síndrome metabólico.

	<b>OMS (1998)</b>	<b>EGIR (1999)</b>	<b>NCEP ATP III (2001)</b>	<b>AACE (2003)</b>	<b>IDF (2005)</b>
<b>DIAGNÓSTICO</b>	DM2, IG, GBA y/o resistencia insulina + 2 de los restantes parámetros	Hiperinsulinemia en ayunas + 2 de los restantes parámetros	3 o más de los siguientes parámetros	Resistencia a la insulina + 1 de los restantes parámetros	Aumento CC + 2 de los restantes parámetros
<b>Obesidad</b>	IC-C > 0,90 (v) o > 0,85 (m) y/o IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	CC ≥ 94 cm (v) o ≥ 80 cm (m)	CC ≥ 102 cm (v) o ≥ 88 cm (m)	IMC > 25 kg/m <sup>2</sup>	CC ≥ 102 cm (v) o ≥ 88 cm (m) diferencias étnicas
<b>Alteración en la regulación de la glucosa</b>	DM2, IG, GBA y/o resistencia insulina	Hiperinsulinemia Glucemia ayunas ≥ 110 mg/dL (no DM2)	Glucemia ayunas ≥ 100 mg/dL (incluyendo DM2)	PTG con glucemia a las 2 h > 140 mg/dL (no DM2)	Glucemia ayunas ≥ 100 mg/dL (incluyendo DM2)
<b>Triglicéridos</b>	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL
<b>HDL-colesterol</b>	< 35 mg/dL (v) o < 39 mg/dL (m)	< 40 mg/dL	< 40 mg/dL (v) o < 50 mg/dL (m)	< 40 mg/dL (v) o < 50 mg/dL (m)	< 40 mg/dL (v) o < 50 mg/dL (m)
<b>Presión arterial</b>	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg
<b>Microalbuminuria</b>	SÍ	NO	NO	NO	NO

AACE, Asociación Americana de Endocrinología Clínica; CC, circunferencia cintura; DM2, diabetes mellitus tipo 2; EGIR, Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina; GBA, glucemia basal alterada; IC-C, índice cintura-cadera; IDF, Federación Internacional de Diabetes; IG, intolerancia a la glucosa; IMC, índice de masa corporal; NCEP-ATP III, Programa Norteamericano para la Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos; OMS, Organización Mundial de la Salud; PTG, prueba tolerancia oral glucosa; v, varones; m, mujeres.



La existencia de varias definiciones del SM ha dificultado el conocimiento de su epidemiología e impacto. Afortunadamente, un comité internacional, compuesto por la *Diabetes Federation*, la *American Heart Association*, la *National Heart Federation*, la *International Atherosclerosis Society* y la *International Association for the Study of Obesity*, propuso en 2009 una definición armonizada y consensuada que facilita la comparación entre estudios<sup>9</sup>. Esta **definición internacional armonizada** establece criterios comunes a nivel mundial para el diagnóstico considerando que existe SM cuando están presentes tres o más de los siguientes factores:

- **Perímetro de cintura**  $\geq 102$  cm (varones) o  $\geq 88$  cm (mujeres). Tiene en cuenta que el riesgo asociado a este parámetro es diferente en función de la población y determina puntos de corte para los diferentes grupos étnicos.
- **Triglicéridos (TG)**  $\geq 150$  mg/dL.
- **HDL-colesterol (HDLc)**  $< 40$  mg/dL (varones) o  $< 50$  mg/dL (mujeres).
- **Glucemia basal**  $\geq 100$  mg/dL o presencia de DM.
- **Presión arterial**  $\geq 130/85$  mmHg o estar con tratamiento antihipertensivo.

Sin embargo, un artículo posterior promovido por la OMS propuso lo que se podría llamar síndrome metabólico premórbido (SMP), que excluye los individuos que padecen DM o ECV y en los que ya solo se puede emplear la prevención secundaria<sup>10</sup>. Considerar solo el SMP permite delimitar la población para establecer estrategias de prevención primaria.

A pesar de la definición armonizada, el continuo avance en el conocimiento de la fisiopatología de la obesidad, de la DM tipo 2 y de enfermedades relacionadas sugiere que en un futuro cercano puedan añadirse otros criterios en el diagnóstico del SM, sobre todo relacionados con marcadores inflamatorios.

## 2. Epidemiología del síndrome metabólico

La prevalencia del SM varía en función de la región estudiada, de las características de la población (sexo, edad, raza...) y de los criterios diagnósticos empleados. El uso de diferentes definiciones dificulta la comparación directa entre los estudios realizados<sup>11</sup>. La IDF estima que un cuarto de la población mundial presenta SM. El sedentarismo, un nivel socioeconómico alto y un índice de masa corporal (IMC) elevado se han asociado de forma significativa con el SM. Existen

determinados factores que influyen en la prevalencia del SM y la alteración de los diferentes componentes que lo definen como la dieta, el nivel de actividad física, el tabaquismo, el historial familiar de diabetes, factores genéticos y la educación<sup>12</sup>. De hecho, se ha descrito una asociación inversa entre el nivel de educación y el riesgo de SM. En países desarrollados, la prevalencia del SM es superior en áreas urbanas que en zonas rurales<sup>13</sup>.

Aunque existen diferencias en la prevalencia del SM en función de la zona geográfica considerada, se trata de una condición clínica con una tendencia ascendente en las últimas décadas y que, dada su implicación en el desarrollo de DM y ECV, supone un problema de salud pública importante que debe ser abordado de forma transversal por las autoridades políticas y sanitarias.

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada entre 2007 y 2014 en EEUU, que tiene en cuenta los criterios propuestos por NCEP-ATP III, arrojó datos de la frecuencia del SM entre la población estadounidense. La prevalencia en la población adulta fue del 34,3% (35,3% en varones y 33,3% en mujeres). Además, el estudio aportó que el SM se relaciona con la edad, pues se obtuvieron datos de prevalencia del 19,3%, 37,7% y 54,9% para individuos de edad comprendida entre 20-39, 40-59 y  $\geq 60$  años, respectivamente. Cabe destacar el aumento en la prevalencia de la obesidad abdominal –especialmente en mujeres– en relación con estudios anteriores<sup>14</sup>.

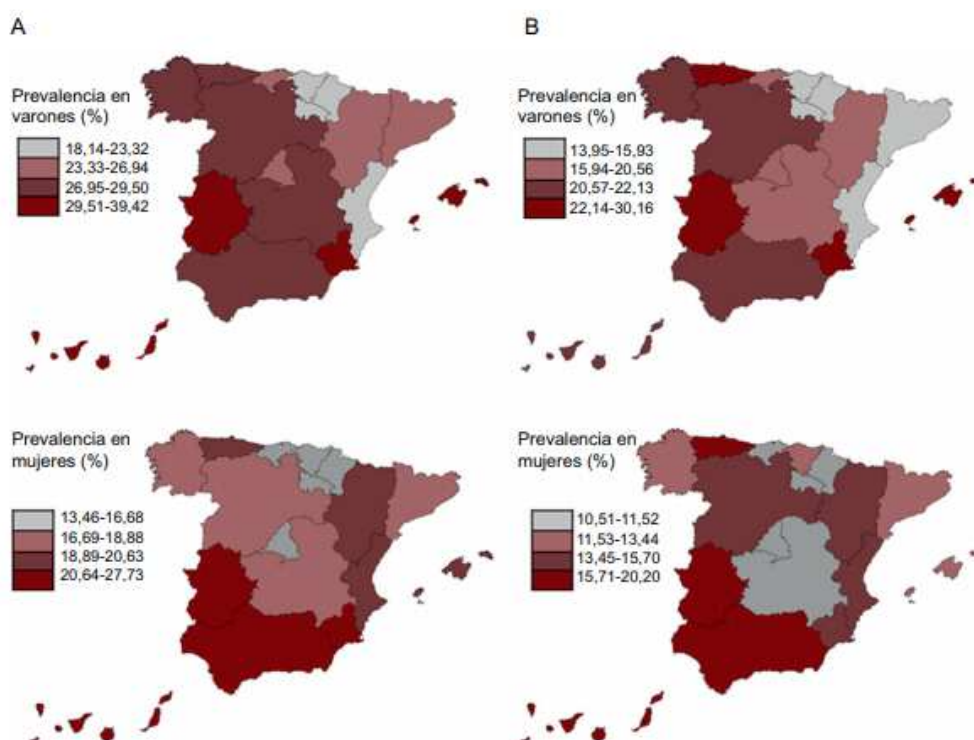
Según el grupo de trabajo en SM de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), una de cada tres o cuatro personas mayores de 20 años cumple criterios para diagnóstico de SM, en función de la definición empleada y los puntos de corte que se establezcan. En Latinoamérica la prevalencia de SM aumenta con la edad, es un poco más frecuente en mujeres y se ha incrementado en la última década<sup>15</sup>.

En China, entre 1992 y 2002, la prevalencia de SM pasó del 8 al 10,6% en áreas urbanas y del 4,9% al 5,3% en zonas rurales. Asumiendo un incremento similar, Saklayen proponía un prevalencia estimada en 2017 del 15,5%<sup>11</sup>.

En Europa destaca el estudio llevado a cabo por el Consorcio MARE (Metabolic síndrome and ARteries REsearch) que incluyó a 34.821 sujetos divididos en 12 cohortes procedentes de 10 países europeos y una de EEUU. El estudio, que siguió los criterios establecidos por NCEP ATP III, puso de manifiesto que la prevalencia del SM era del 24,3% (23,9% en varones y 24,6% en mujeres). Cabe mencionar la

variabilidad en los parámetros que definen el SM en función de la zona geográfica. La combinación de obesidad abdominal, hipertrigliceridemia e hipertensión se observó en el 12% de los sujetos con SM pero fue más común en Reino Unido (32,3%), Italia (19,6%) y Alemania (18,5%) que en Suecia (1,2%), España (2,6%) y EEUU (2,5%). En cambio, el conjunto de hiperglucemia, hipertensión y obesidad abdominal, que también se observó en el 12,7% de los individuos con SM, tuvo mayor protagonismo en el sur de Europa (Italia, España y Portugal, con una prevalencia del 31,4%, 18,4% y 17,1%, respectivamente) y Bélgica (20,4%) que en el Norte de Europa (Alemania, Suecia y Lituania, con porcentajes del 7,6%, 9,4% y 9,6%, respectivamente)<sup>16</sup>.

En España, se han realizado tres estudios nacionales que han proporcionado datos de prevalencia de SM teniendo en cuenta la definición armonizada y en algunos casos considerando también el SMP. El estudio DARIOS incluyó 24.670 individuos de 10 comunidades autónomas con edades comprendidas entre 35 y 74 años. La prevalencia del SM fue del 31% (varones 32% y mujeres 29%). Entre los varones, la hiperglucemia y los niveles elevados de TG fueron las alteraciones más frecuentes; sin embargo, en el caso de las mujeres predominaron la obesidad abdominal y los niveles bajos de HDLc. La prevalencia del SMP disminuyó al 24% debido a la exclusión de sujetos con DM o ECV ya instaurada. El incremento del riesgo coronario predominó en las mujeres, tanto en el SM como en el SMP<sup>17</sup>. El estudio di@bet.es caracterizó la frecuencia del SM en individuos de 18-90 años en el período comprendido entre 2008 y 2010, contó con 4.727 sujetos y reportó una prevalencia de SM del 32% en mujeres y del 42% en varones. El incremento de la prevalencia en este estudio se debe al uso de puntos de corte para la obesidad abdominal más bajos<sup>18</sup>. Por último, el estudio ENRICA es un estudio transversal realizado de 2008 a 2010 sobre 11.149 personas representativas de la población española mayor de 18 años. La prevalencia del SM fue del 22,7% y la del SMP del 16,9%, aumentó con la edad y fue mayor en varones que en mujeres hasta los 65 años; a partir de esta edad, fue superior en mujeres. Una de las aportaciones más importantes de este estudio es que describió la prevalencia por comunidades autónomas. Se detectaron importantes diferencias geográficas siendo las comunidades del sur de España y las insulares las que presentaron mayor prevalencia, como se muestra en la figura 1<sup>19</sup>.



**Figura 1.** Prevalencia de síndrome metabólico [A] y síndrome metabólico premórbido [B] en la población adulta española en 2008-2010 por comunidades autónomas. Análisis estandarizado por sexo y edad. Estudio ENRICA<sup>19</sup>.

## 2.1 Epidemiología de la obesidad

La obesidad es un factor de riesgo bien conocido en enfermedades como la DM tipo 2, las ECV y algunos tipos de cáncer. El sobrepeso se define en adultos como un IMC entre 25-30 kg/m<sup>2</sup> y la obesidad como un IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>. Constituyen uno de los retos más difíciles en salud pública que debe afrontar la sociedad actual pues los datos son alarmantes. Según la OMS, desde 1975 la obesidad se ha triplicado en todo el mundo<sup>20</sup>. En 2016 el 39% de los adultos tenían sobrepeso y el 13% eran obesos. Los datos de obesidad infantil son aún más preocupantes, en ese mismo año había 41 millones de niños menores de cinco años y más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 18 años) con sobrepeso u obesidad<sup>21</sup>. La prevalencia de obesidad es mayor en América del Norte, Europa, Oriente Próximo y Oceanía mientras que el sudeste asiático es la región donde la obesidad tiene menor impacto. Además, la obesidad predomina entre las mujeres en varias de las regiones.

En España los datos de la OMS coinciden con el estudio ENPE, según el cual la prevalencia de sobrepeso en la población adulta española es del 39,3% y la de obesidad del 21,6% (22,8% entre los varones y el 20,5% entre las mujeres). Por comunidades autónomas, las tasas de obesidad más altas corresponden al Principado de Asturias (25,7%), Galicia (24,9%) y Andalucía (24,4%) mientras que las tasas más bajas se observan en Islas Baleares (10,5%), Cataluña (15,5%) y País Vasco (16,8%)<sup>22</sup>.

El riesgo cardiovascular asociado a la obesidad depende en gran medida de la localización de la grasa corporal, siendo la que se acumula en el abdomen la que supone un mayor riesgo. De hecho, es la obesidad abdominal el parámetro que se utiliza en la mayoría de las definiciones de SM. Los puntos de corte aplicados para definirla dependen de la región estudiada. En nuestro entorno se considera que existe obesidad abdominal cuando el perímetro de la cintura es  $\geq 88$  cm en las mujeres y  $\geq 102$  en los varones. Si comparamos estudios que consideran estos límites, podemos observar que la prevalencia se sitúa entre el 30 y el 40% en España, Canadá, Alemania o Brasil, pero aumenta hasta el 56% en EEUU<sup>23</sup>. En todos los casos, la prevalencia en mujeres es significativamente mayor. El estudio ENPE aportó prevalencias de obesidad abdominal del 33,4%, con tasas más elevadas entre las mujeres (43,3%) que entre los varones (23,3%).

## 2.2 Epidemiología de la hiperglucemia y la diabetes

La DM es una enfermedad metabólica caracterizada por la persistencia de niveles elevados de glucosa en sangre, por defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. Los criterios para su diagnóstico son niveles de glucemia en ayunas  $\geq 126$  mg/dL o  $\geq 200$  mg/dL a las dos horas tras sobrecarga oral de glucosa.

Existen distintos tipos de diabetes: DM tipo 1 (de origen autoinmune, en la que hay una pérdida completa de la producción de insulina), DM tipo 2, diabetes gestacional... Sin duda, la forma más común de diabetes es la de tipo 2 (90% de los casos), cuya prevalencia ha experimentado un notable crecimiento a nivel mundial paralelamente al aumento de la obesidad y el sedentarismo. Se caracteriza por la resistencia al efecto de la insulina en los tejidos, aunque también puede haber defectos en la secreción. Además de ser un importante factor de riesgo cardiovascular, la diabetes es la principal causa de ceguera, insuficiencia renal y de amputación no traumática de extremidades inferiores en países desarrollados. De ahí

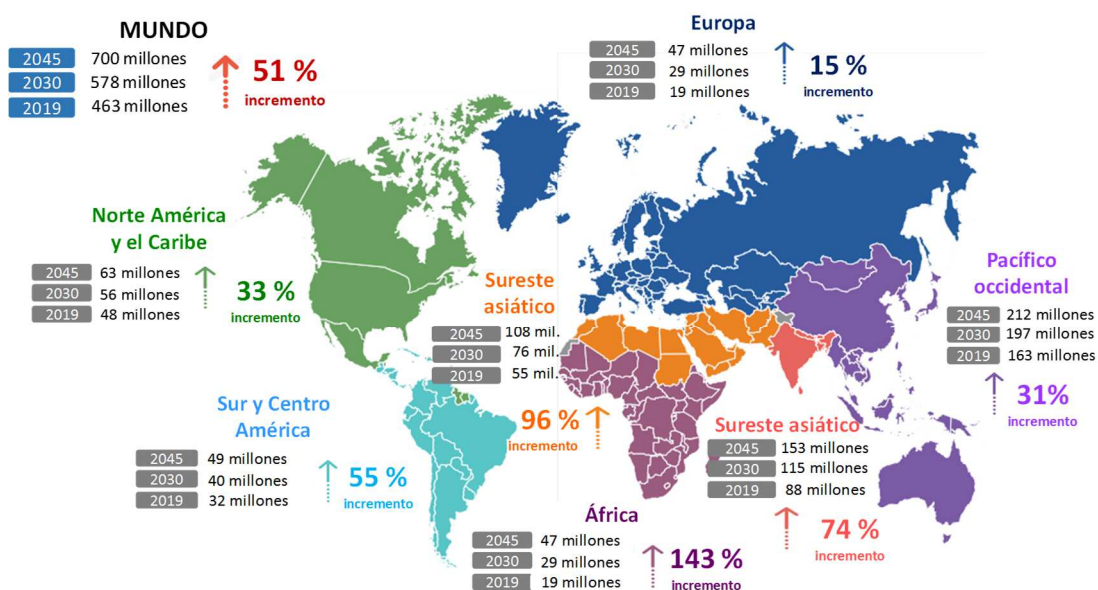
la importancia de la prevención, diagnóstico precoz y control adecuado de esta patología<sup>24</sup>.

Según los datos de la OMS, desde 1980 la prevalencia mundial de la diabetes ha aumentado casi al doble (del 4,7% al 8,5%) en la población adulta. La diabetes causó 1,6 millones de muertes en 2016, de las cuales, el 43% se produce antes de la edad de 70 años<sup>25</sup>. Según la IDF, el 9,3% de los adultos entre 20 y 79 años tiene diabetes y alrededor del 7,5% de los adultos tienen tolerancia a la glucosa alterada. Para 2045 se estima que uno de cada diez tendrá diabetes y se espera que la prevalencia de tolerancia alterada a la glucosa aumente hasta el 8,6% de la población adulta. Además, hay evidencia de que la DM tipo 2 en niños y adolescentes está aumentando en algunos países como consecuencia de la obesidad y el sedentarismo. En la tabla 2 y la figura 2 se indica la prevalencia de diabetes en el mundo y por regiones en 2019, 2030 y 2045 estimada por la IDF. Las regiones con mayor prevalencia de diabetes en 2019 fueron América del Norte y el Caribe<sup>26</sup>.

**Tabla 2.** Prevalencia de diabetes por regiones en 2019, 2030 y 2045 (20-79 años). Datos de la IDF<sup>26</sup>.

	Prevalencia 2019 (%)	Prevalencia 2030 (%)	Prevalencia 2045 (%)
<b>Global</b>	<b>9,3</b>	<b>10,2</b>	<b>10,9</b>
Oriente Medio y Norte de África	12,8	14,3	15,7
Pacífico Occidental	9,6	11,0	11,8
Sureste Asiático	8,8	9,7	11,3
<b>Norte América y Caribe</b>	<b>13,3</b>	<b>14,2</b>	<b>15,0</b>
Sur y Centro América	9,4	10,6	11,8
<b>Europa</b>	<b>8,9</b>	<b>9,8</b>	<b>10,3</b>
África	3,9	4,1	4,4

En 2018 el Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas presentó en el marco del XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Diabetes, los resultados preliminares de la segunda parte del estudio di@bet.es que reevalúa la misma cohorte poblacional estudiada en el período 2008-2010. Recoge la incidencia de la DM tipo 2 en España, cifrándola en 11,58 casos por 1.000 personas y año (más de 380.000 nuevos casos cada año)<sup>27</sup>.



**Figura 2.** Número de personas con diabetes en el mundo y por regiones en 2019, 2030 y 2045 (20-79 años), según estimaciones de la IDF<sup>26</sup>.

### 2.3 Epidemiología de la dislipemia

Varios estudios muestran que los pacientes con hipertrigliceridemia y/o niveles bajos de HDLc tienen más riesgo de sufrir enfermedad arterial coronaria<sup>28</sup>. La hipercolesterolemia, aunque no forma parte de los criterios que definen el SM, también aumenta el riesgo cardiovascular. Valores de colesterol total (CT) en sangre por debajo de 200 mg/dL y de LDL-colesterol (LDLc) inferiores a 130 mg/dL se consideran normales.

Según un informe elaborado por Cardiovascular Resource Group, 133 millones de personas residentes en los cinco países más poblados de Europa (Alemania, Francia, Italia, España y Reino Unido) tienen niveles de LDLc elevados. En EEUU., el 62% de las personas mayores de 50 años tiene hipercolesterolemia<sup>29</sup>. Además, un estudio reciente concluye que más del 50% de la población europea presenta altos niveles de colesterol en sangre<sup>30</sup>. En España, los datos aportados por el estudio ENRICA confirmaron esta prevalencia (50,5%). En varones, se aprecia un aumento importante de la prevalencia de valores de CT y LDLc elevados a partir de los 30-44 años (CT, 46,9% y LDLc, 44,9%) y en mujeres, el aumento se produce especialmente entre los 45-64 años (CT, 70,2% y LDLc, 59,8%)<sup>19</sup>.

### **2.4 Epidemiología de la hipertensión**

La hipertensión arterial (HTA) es una situación patológica caracterizada por un aumento crónico de la presión arterial por encima de los valores considerados normales (140 de presión arterial sistólica -PAS- y 90 de presión arterial diastólica). No es una enfermedad en el sentido habitual de la palabra, de hecho, se conoce como la “asesina silenciosa”, pues durante la mayor parte de su historia natural no presenta síntomas y cuando estos aparecen puede ser demasiado tarde, pues corresponden a graves complicaciones como el infarto agudo de miocardio o el ictus.

La prevalencia mundial de la HTA se ha estimado en 1.130 millones en 2015, con una afectación en Europa central y oriental de más de 150 millones. En términos generales, la HTA en adultos se sitúa alrededor de un 24% en varones y del 20% en mujeres. En 2015, Europa central y oriental, África subsahariana y Asia meridional tenían los niveles más altos de presión arterial. El número de adultos con presión arterial elevada aumentó en gran medida en países con ingresos bajos y medios<sup>31</sup>, datos que concuerdan con los aportados por la OMS. La HTA es más frecuente a edades avanzadas y alcanza una prevalencia que supera el 60% en personas de más de 60 años. Debido al envejecimiento de la población, el estilo de vida sedentario y el aumento de la obesidad, se estima que la prevalencia de la HTA seguirá aumentando en todo el mundo. Se calcula que el número de personas con HTA aumentará en un 15-20% en 2025 y llegará a 1.500 millones<sup>32</sup>. Según la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA), el 33% de los adultos en España son hipertensos (66% en mayores de 60 años)<sup>33</sup>.



### 3. Fisiopatología del síndrome metabólico

El mecanismo fisiopatológico del SM no se conoce en su totalidad, pero la obesidad abdominal y la resistencia a la insulina tienen un papel central. Además, se acepta que el SM se caracteriza por la existencia de un estado proinflamatorio y por la implicación del estrés oxidativo en su desarrollo<sup>34,35</sup>.

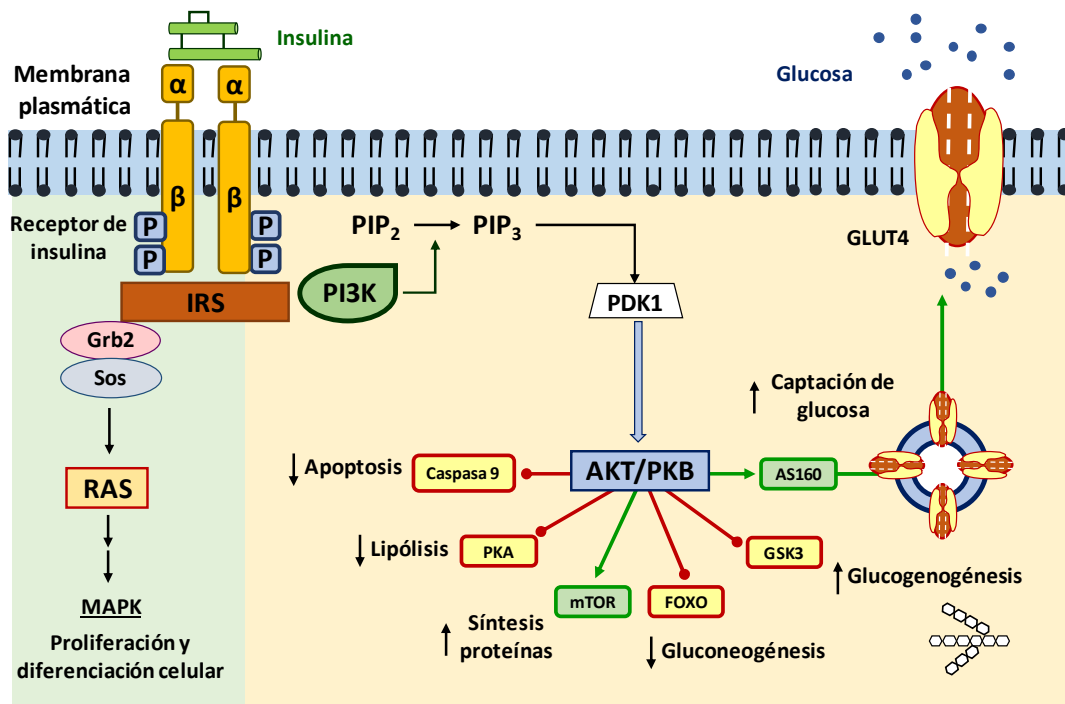
Antes de continuar con la fisiopatología del SM, conviene recordar algunos aspectos sobre la insulina y el metabolismo lipídico.

#### 3.1 Insulina

La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos producido y secretado por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. El principal estímulo para la liberación de insulina es el aumento de la glucemia aunque las células  $\beta$  también responden a otros sustratos energéticos (aminoácidos, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos), a incretinas, a adipocinas o a la activación parasimpática<sup>36</sup>.

La insulina se fija a receptores específicos de membrana pertenecientes a la familia de receptores con actividad tirosinasa (figura 3). Están constituidos por 2 subunidades  $\alpha$ , de localización extracelular y dos subunidades  $\beta$ . La unión de la insulina a la subunidad  $\alpha$  genera cambios conformacionales que llevan a la autofosforilación de varios residuos de tirosina de la subunidad  $\beta$ . El receptor insulínico, además de autofosforilarse, fosforila en sus residuos de tirosina otras proteínas citosólicas llamadas sustrato del receptor insulínico (IRS), de los cuales destacan IRS-1 y 2. Éstos son los principales intermediarios en la etapa inicial de señalización de la insulina. La mayoría de las acciones de la insulina se llevan a cabo mediante la activación de dos rutas de señalización: la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), que regula la expresión génica y los efectos proliferativos asociados a la insulina, y la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/AKT, responsable de la mayoría de sus acciones metabólicas. AKT, anteriormente conocido como proteína cinasa B (PKB), desempeña un papel central en la acción de la insulina pues estimula la captación de glucosa mediante la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática, la síntesis de glucógeno al inhibir la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) y la síntesis de proteínas a través de la vía mTOR. También inhibe la lipólisis al inhibir la proteína cinasa A (PKA), la gluconeogénesis y la apoptosis<sup>37,38,39</sup>.

Aunque el efecto más visible de la insulina es la reducción de la glucemia, su papel en la regulación del metabolismo es clave. Los principales tejidos diana de la insulina son el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. En el hígado estimula la síntesis de glucógeno, la glucólisis y la lipogénesis mientras que inhibe la gluconeogénesis, la glucogenolisis, la lipólisis y el catabolismo proteico. En el músculo acelera el transporte de glucosa al interior celular a través de la translocación de GLUT4, estimula la glucogenogénesis y promueve la síntesis proteica. En el tejido adiposo favorece el depósito de grasa; para ello, reduce la lipólisis intracelular mediante la inhibición de la lipasa intracelular, favorece la captación de glucosa (que genera los sustratos necesarios para la síntesis de ácidos grasos y TG) y activa la lipoproteína lipasa del plasma que, al hidrolizar los TG de las lipoproteínas plasmáticas, proporciona ácidos grasos para la lipogénesis<sup>40-43</sup>.

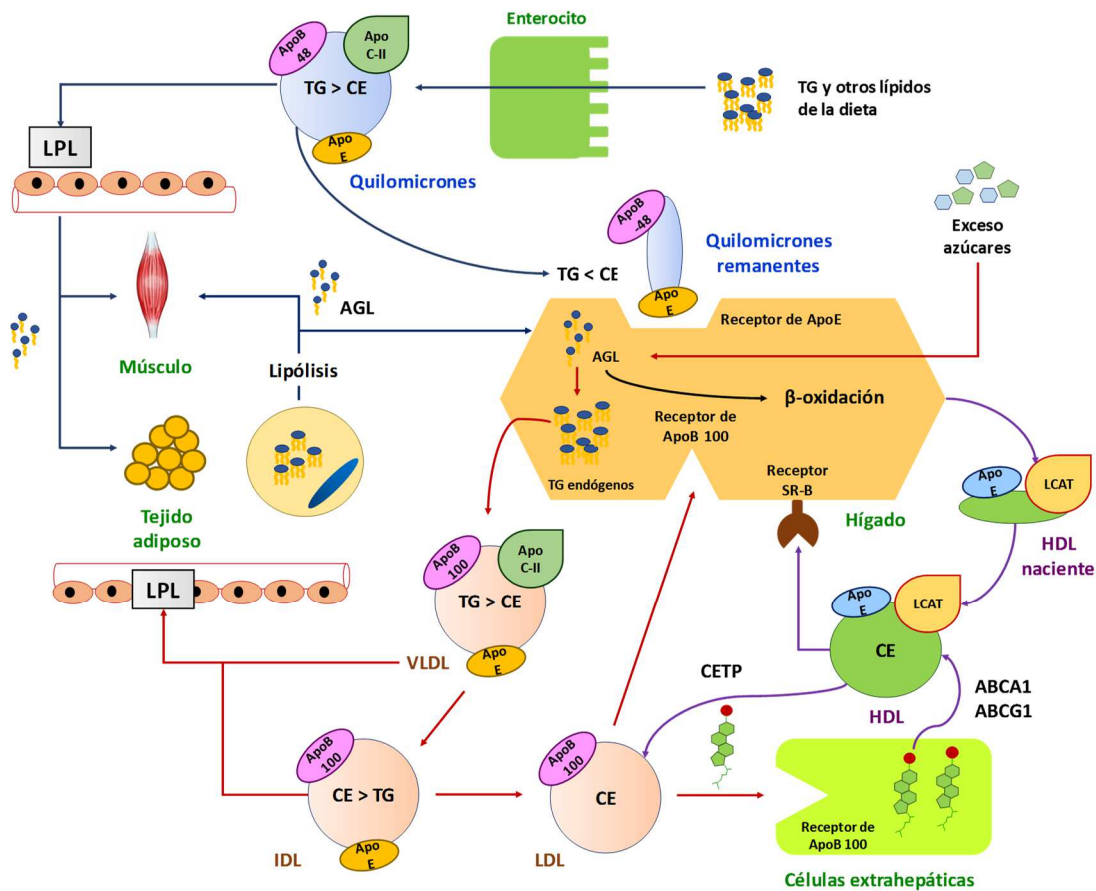


**Figura 3.** Mecanismo de acción y ruta de señalización de la insulina. GLUT4, transportador de glucosa 4; GSK3, glucógeno sintasa cinasa 3; IRS, sustrato del receptor insulínico; MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos; mTOR, diana de rapamicina en mamíferos; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PIP<sub>3</sub>, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato; PKA, proteína cinasa A; PKB, proteína cinasa B.

### 3.2 Lipoproteínas y transporte de lípidos

La figura 4 muestra una visión general de la formación y transporte de las lipoproteínas. Los lípidos de la dieta se absorben en el intestino delgado. Las sales biliares emulsionan las grasas ingeridas y forman micelas que facilitan el acceso de las lipasas intestinales. Los ácidos grasos y otros productos de degradación se absorben por la mucosa intestinal y se convierten en TG que se empaquetan junto con el colesterol de la dieta y proteínas específicas denominadas apolipoproteínas (apoB-48) para formar agregados lipoproteicos denominados quilomicrones. Los quilomicrones alcanzan la circulación sistémica a través del sistema linfático y en el torrente circulatorio adquieren apoC-II y apoE. La apoC-II activa la lipoproteína lipasa (LPL) en los capilares de los tejidos adiposo y muscular permitiendo la liberación de ácidos grasos a estos tejidos. En el músculo, los ácidos grasos se oxidan para obtener energía; en el tejido adiposo, se reesterifican para su almacenamiento en forma de TG. Los quilomicrones residuales (o remanentes), desprovistos de la mayor parte de sus TG, se catabolizan en el hígado previa interacción con el receptor de apoE<sup>44-46</sup>.

Cuando la dieta contiene más ácidos grasos y colesterol de los que son necesarios de forma inmediata como combustible o como precursores de otras moléculas se convierten en TG o ésteres del colesterol en el hígado y se empaquetan con apolipoproteínas específicas (apoB-100, apoC-II, apoE) formando las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Cuando se ingieren en exceso, los glúcidos se convierten en TG en el hígado exportándose en forma de VLDL. Además, si la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo se ve superada debido a un elevado aporte dietético de lípidos o cuando la movilización de los TG almacenados es excesiva (por ejemplo, en caso de resistencia a la insulina) se liberan ácidos grasos a la sangre que también contribuyen a la síntesis hepática de TG y a la liberación de VLDL. Las VLDL interaccionan con LPL y apoC-II, liberándose ácidos grasos libres que son captados por los tejidos extrahepáticos. La descarga de TG transforma las lipoproteínas en VLDL residuales, denominadas lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Las IDL pueden catabolizarse en el hepatocito al interaccionar con el receptor de apoE o de apoB-100, o bien convertirse en LDL por la pérdida adicional de TG y de algunas apolipoproteínas (la apoB-100 es la principal apolipoproteína que se mantiene). Las LDL que no se captan en los tejidos retornan al hígado y se internalizan al interaccionar con los receptores de LDL hepáticos<sup>47,48</sup>.



**Figura 4.** Lipoproteínas y transporte de lípidos. AGL, ácidos grasos libres; Apo, apoproteína; CE, colesterol éster; CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol; HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LPL, lipoproteína lipasa; SR-B, receptor *scavenger* clase B; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

Las HDL son las responsables del transporte reverso de colesterol y se oponen a la formación de placas de ateroma. Se sintetizan en el hígado y en el intestino como una partícula discoide (HDL naciente) y se transforman en una partícula madura y esférica a medida que capta el colesterol almacenado en tejidos extrahepáticos. Los transportadores de membrana ABCA1 y ABCG1 facilitan el paso del colesterol desde las células a las HDL. En la superficie de éstas, la enzima lecitín-colesterol

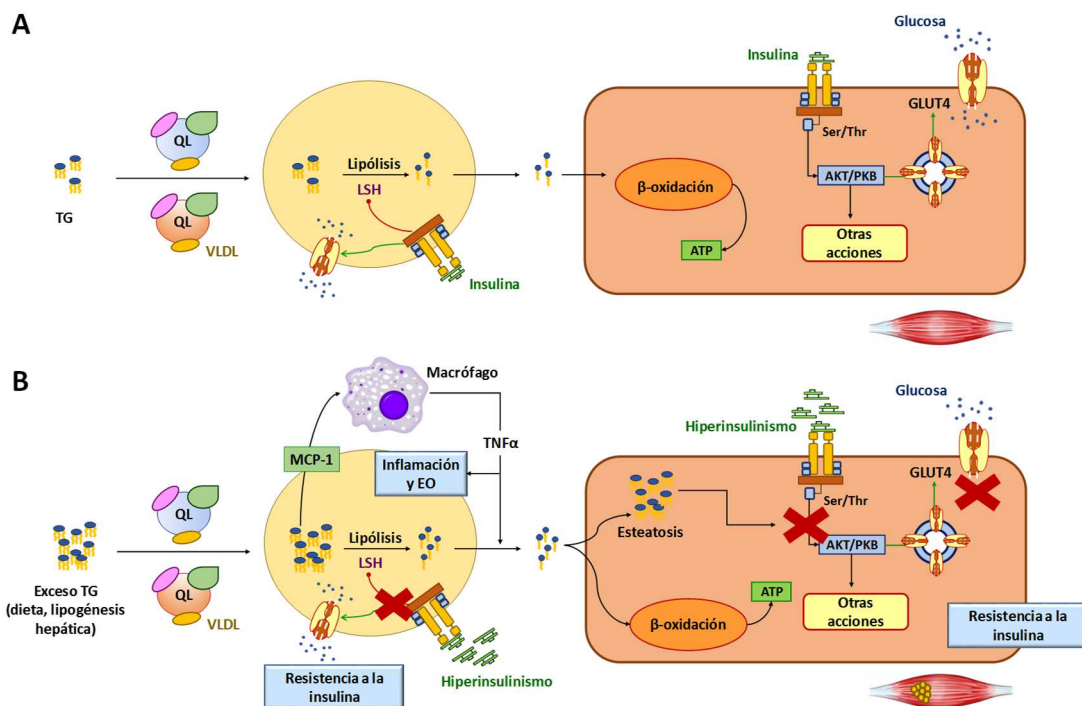
aciltransferasa (LCAT) convierte el colesterol libre en colesterol éster. El colesterol éster puede transferirse al hígado, previa interacción de la lipoproteína con el receptor *scavenger* de clase B (SR-B1). Parte de los ésteres de colesterol de las HDL se puede incorporar a las LDL mediante la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Las HDL también participan en la formación y catabolismo del resto de lipoproteínas captando y transfiriendo las diferentes apolipoproteínas<sup>49,50</sup>.

### 3.3 Obesidad, resistencia a la insulina e inflamación

Una de las características del SM y de la DM tipo 2 es la resistencia a la insulina que supone una disminución de la sensibilidad a esta hormona. Las células diana de la insulina no responden de manera adecuada. Esta situación hace que aumente la secreción de insulina en un intento de compensar el defecto en su actividad generando hiperinsulinemia<sup>12</sup>. El mecanismo de resistencia a la insulina es complejo e intervienen varios factores relacionados con alteraciones en la señalización, tanto a nivel del receptor como de los mecanismos de transducción<sup>34</sup>. Entre las alteraciones más comunes se encuentran: disminución del número de receptores y de su actividad catalítica, aumento de la fosforilación de residuos de serina/treonina del receptor y de las proteínas IRS, aumento de la actividad de fosfatasa que participan en la desfosforilación de los residuos de tirosina, disminución de la actividad de PI3K y AKT o defectos en la expresión y función del transportador GLUT4. El exceso de fosforilación de residuos de serina/treonina de los factores IRS disminuye la fosforilación de los residuos de tirosina, reduciendo la interacción con los elementos posteriores de la cascada de señalización<sup>41,51,52</sup>.

El tejido adiposo parece tener un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina (figura 5). La obesidad, que es el resultado de un balance energético positivo (aumento del ingreso y disminución del gasto energético), se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa. Sin embargo, la expansión del tejido adiposo tiene un límite y, en los individuos con sobrepeso, el exceso en la ingestión de calorías da lugar a adipocitos más grandes abarrotados con TG e incapaces de almacenar más. Este fracaso en la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo da lugar al depósito de grasa en otros tejidos que resulta perjudicial. El tejido adiposo se expande por aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) y por aumento de su tamaño (hipertrofia). En los estadios iniciales de la obesidad, el tamaño de los adipocitos puede llegar a aumentar hasta 20 veces. La hipertrofia

limita la producción de nuevos adipocitos disminuyendo la capacidad almacenadora del tejido adiposo y estimulando la liberación de quimiocinas, que atraen macrófagos. Los macrófagos se infiltran en el tejido adiposo y producen citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF $\alpha$ ). Los macrófagos interfieren en el depósito de TG en los adipocitos y favorecen la salida de ácidos grasos libres a la sangre. Este exceso de ácidos grasos penetra en células musculares y hepáticas, donde se convierten en TG que se acumulan en forma de gotículas<sup>53</sup>.



**Figura 5.** Homeostasis metabólica **[A]** y desarrollo de resistencia a la insulina **[B]**. EO, estrés oxidativo; GLUT4, transportador de glucosa 4; LSH, lipasa sensible a hormona; MCP-1, proteína quimiotáctica de macrófagos; QL, quilomicrones; Ser, serina; TG, triglicéridos; Thr, treonina; TNF $\alpha$ , Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ ; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

La pérdida de la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo y la liberación de citocinas promueven las alteraciones metabólicas características de la resistencia a la insulina y del SM<sup>54</sup>. El almacenamiento ectópico de lípidos en el músculo resulta tóxico, produce resistencia a la insulina y se asocia con una reducción

de la fosforilación de los residuos de tirosina, inhibiendo la actividad de la PI3K en la cascada de señalización de la insulina. Además, el aumento de los niveles intracelulares de ácidos grasos o sus derivados puede reducir la activación de AKT y la captación de glucosa. En el hígado, el exceso de ácidos grasos libres incrementa la producción de glucosa, TG y apo-B, generando VLDL, con efecto aterogénico. Los ácidos grasos libres proceden fundamentalmente del tejido adiposo que se liberan durante la lipólisis activada por la acción de citocinas. En condiciones normales, la lipólisis se activa durante los períodos de ayuno por acción de glucagón, cortisol o catecolaminas pero durante la fase postprandial la liberación de insulina inhibe la lipasa hormono sensible y, por tanto, la lipólisis. En el estado de resistencia insulínica, la lipólisis se mantiene, pues la insulina no ejerce su acción supresora y continúa la liberación de ácidos grasos que se acumulan en depósitos ectópicos manteniendo y amplificando la resistencia<sup>34</sup>.

#### **4. Etiología del síndrome metabólico**

El desarrollo del SM se relaciona con dietas hipercalóricas de alto contenido en grasas y carbohidratos y con el sedentarismo<sup>55</sup>. Existen otros factores que también contribuyen a su aparición como la genética, el historial familiar, la raza o la edad<sup>56-59</sup>.

El aumento de la producción de alimentos para consumo inmediato, la rápida urbanización y el cambio en los estilos de vida han modificado los hábitos alimentarios. En la actualidad predomina el consumo de alimentos procesados que contienen una elevada proporción de grasas y azúcares sencillos para, entre otras cosas, mejorar su palatabilidad y aumentar el consumo. Cabe destacar que más que el consumo total de grasa lo que parece estar relacionado con los efectos perjudiciales a nivel metabólico es el tipo de grasa ingerida. El consumo elevado de grasas saturadas y de grasas trans, tipo de grasas predominante en las carnes, embutidos, bollería o alimentos procesados está íntimamente ligado al desarrollo de obesidad. Por el contrario, los ácidos mono y poliinsaturados han demostrado tener un papel beneficioso disminuyendo el riesgo cardiovascular<sup>60</sup>. En las últimas décadas, la recomendación de reducir el consumo de grasas para disminuir este riesgo ha dominado en las guías de alimentación y nutrición. Aunque su consumo se ha mantenido o ha caído de forma discreta en los últimos años (en EEUU ha disminuido del 37 al 33%, por ejemplo), el problema es que paralelamente a dicho descenso se

ha producido un aumento en la ingesta de carbohidratos, siendo alarmante la contribución de los azúcares simples en la dieta<sup>61,62</sup>. Además, a pesar de la reducción en el consumo de grasa, la ingesta de grasas saturadas y grasas trans continúa por encima de las recomendaciones dietéticas y predominan en determinados grupos de alimentos muy utilizados y demandados.

El consumo de azúcar se ha disparado en las últimas décadas. Según la Encuesta Nacional de Consumo de alimentos y bebidas (encuesta ENALIA), realizada entre 2013 y 2015 en España por la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, la ingesta media de azúcares totales (monosacáridos y disacáridos intrínsecos y añadidos) es de 78 g/día en adultos y de 95 g/día en la población infantil y adolescente, lo que supone el 19% y el 21% de la energía total diaria, respectivamente<sup>63</sup>. Estos datos son similares a los de EEUU (72 g/día) y otros países de Europa y están muy por encima de las recomendaciones de la OMS que aconseja un consumo de azúcares simples por debajo del 10% o del 5%, según el criterio, de la ingesta calórica total<sup>64</sup>. Dentro de los azúcares sencillos cabe destacar el importante consumo de fructosa y su contribución al elevado contenido calórico de las dietas occidentales. La fructosa comenzó a utilizarse como edulcorante en la década de los 60 con la producción del jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF) que aumentaba la estabilidad de los alimentos y reducía los costes de producción. Así, la creación del JMAF-42 en 1967 y del JMAF-55 en 1977 (con un contenido en fructosa del 42% y del 55%, respectivamente) mejoró las expectativas de la industria alimentaria<sup>65</sup>. Otra fuente importante de fructosa es la sacarosa que contiene una proporción de fructosa similar al JMAF. La sacarosa y el JMAF se incorporan a numerosos alimentos, especialmente bebidas azucaradas (zumos, refrescos, bebidas deportivas), dulces y bollería. Hasta la incorporación del JMAF, la frutas y vegetales eran la principal fuente de fructosa. El exceso de azúcares añadidos en los alimentos ha hecho que el consumo de fructosa haya aumentado alrededor del 30% en los últimos 40 años<sup>66</sup>.

Uno de los principales modelos experimentales empleados para inducir el SM en animales se basa en el empleo de dietas con alto contenido en grasa y/o azúcares sencillos (fructosa o sacarosa), que han confirmado la importancia de la alimentación en el desarrollo de las diferentes alteraciones características del SM<sup>67</sup>.



#### 4.1 Papel de la fructosa en el síndrome metabólico

La fructosa es un monosacárido de 6 átomos de carbono que presenta un grupo cetónico al tratarse de una cetohehexosa. La fructosa ingerida o liberada tras la hidrólisis de la sacarosa se absorbe por transporte pasivo en el intestino delgado a través del transportador GLUT5, que tiene una elevada afinidad por la fructosa<sup>68</sup>. El hígado presenta una gran capacidad de extracción de fructosa, por lo que la concentración plasmática se mantiene baja y apenas se eleva tras la ingesta. El metabolismo de la fructosa (figura 6) tiene lugar fundamentalmente en el hígado, aunque también se puede producir en el músculo o el riñón, en los que la ruta de degradación difiere poco de la vía empleada por la glucosa. En estos tejidos, la hexoquinasa fosforila la fructosa produciendo fructosa 6-fosfato que ingresa en la glucólisis. En el hígado, el metabolismo de la fructosa es diferente, ésta entra en el hepatocito principalmente a través del transportador de glucosa GLUT2. En el citoplasma, la fructocinasa cataliza la fosforilación de la fructosa en el carbono 1, reacción dependiente de ATP. La fructosa 1-fosfato sufre una ruptura aldólica formando gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato por acción de la fructosa 1-fosfato aldolasa o aldolasa B. Los dos productos de la hidrólisis de la fructosa 1-fosfato entran en la glucólisis en forma de gliceraldehído 3-fosfato. El catabolismo de la fructosa en el hígado elude el paso de la glucólisis catalizado por la fosfofructocinasa I, por tanto, evita el principal punto de control. De esta manera, el metabolismo de la fructosa no se detiene y se obtiene triosa fosfato que tiene como principal destino la lipogénesis. No obstante, también pueden seguir otras vías metabólicas: gluconeogénesis, glucogenogénesis, formación de lactato o fosforilación oxidativa<sup>69,70</sup>.

Cuando se ingieren cantidades elevadas de fructosa se obtiene un exceso de unidades acetilo que se utilizan para la síntesis de ácidos grasos<sup>71</sup>. A partir de los ácidos grasos sintetizados se forman los TG, que se empaquetan junto con colesterol y apolipoproteínas específicas para formar las lipoproteínas VLDL. Cuando la síntesis de ácidos grasos es elevada, la maquinaria de transporte mediante VLDL se ve superada y se produce la acumulación de TG en el hepatocito o la liberación de ácidos grasos libres a la sangre. El aumento de VLDL y de ácidos grasos libres en plasma produce dislipemia y acumulación hepática de lípidos, que conduce al desarrollo de esteatosis característica de la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA)<sup>72</sup>. Además, la fructosa también influye en la expresión de las enzimas que participan en la lipogénesis (figura 6)<sup>65</sup>.

El incremento en la síntesis y liberación hepática de lípidos conlleva una acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo que conduce al desarrollo de obesidad y de resistencia a la insulina. Además, la acumulación de lípidos en el hígado también contribuye al desarrollo de resistencia insulínica a nivel hepático y de un estado proinflamatorio prooxidante<sup>65,73</sup>.

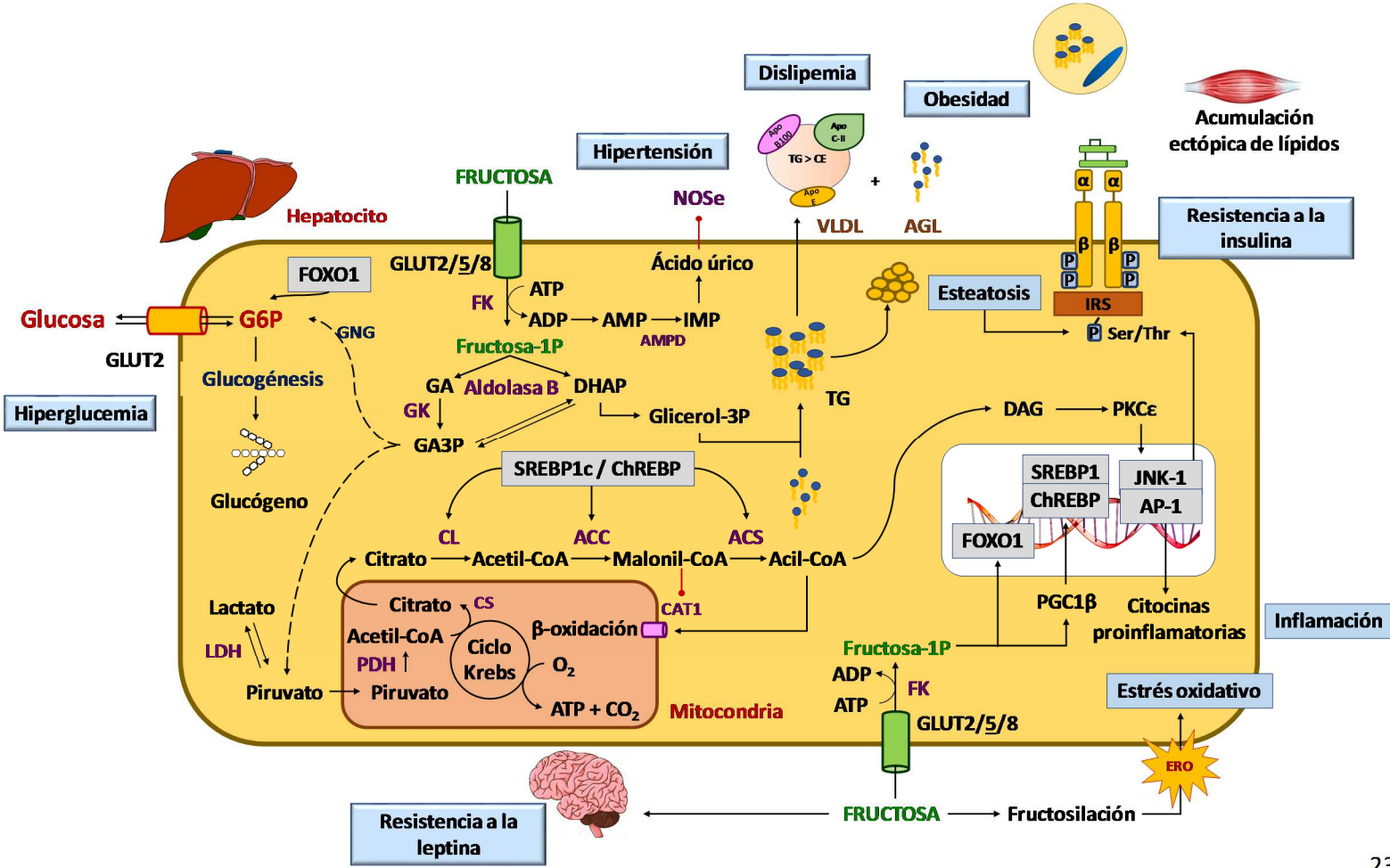
Por otra parte, se han propuesto mecanismos adicionales que explican el papel de la fructosa en el desarrollo del SM. La depleción de ATP debido a la fosforilación inicial de la fructosa aumenta los niveles de AMP y ADP que estimulan la adenosina desaminasa, activando la vía de degradación de las purinas y generando ácido úrico. El ácido úrico se ha implicado en el desarrollo de hipertensión asociada al consumo de fructosa, ya que inhibe la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS<sub>e</sub>), enzima responsable de la síntesis de óxido nítrico (NO), agente vasodilatador clave en la regulación de la función endotelial<sup>72,74</sup>.

El hiperinsulinismo derivado de la resistencia insulínica también se ha propuesto como factor implicado en el desarrollo de la hipertensión en el SM pues parece aumentar la actividad simpática e incrementar la reabsorción renal de sodio.

La fructosa también aumenta la activación del factor de transcripción FOXO1, que aumenta la expresión de enzimas implicadas en la gluconeogénesis, lo que contribuye al desarrollo de hiperglucemia<sup>75</sup>.

La obesidad asociada al consumo excesivo de fructosa también se explica por el aumento que produce en la ingesta calórica al estimular la liberación de hormonas orexígenas<sup>76</sup>. Además, la fructosa aumenta la ingesta de forma indirecta; la hiperinsulinemia limita el paso de la leptina a través de la barrera hematoencefálica. La leptina es una adipocina liberada por el tejido adiposo en respuesta al aumento del número y tamaño de los adipocitos que suprime el apetito y estimula el gasto energético. La hiperinsulinemia secundaria a la resistencia insulínica antagoniza la señalización de la leptina<sup>77</sup>.

En sangre, la fructosa puede estar en forma lineal o en forma cíclica (anillo de furanosa), predomina la primera debido a que el impedimento estérico producido por los grupos hidroximetilo hacen inestable el anillo de furanosa. El grupo carbonilo de la fructosa lineal puede unirse al grupo ε-amino de la lisina de una proteína mediante una reacción no enzimática y producir la fructosilación de las proteínas, que altera la funcionalidad proteica y estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)<sup>72,78,79</sup>.



**Figura 6.** Metabolismo hepático de la fructosa e implicación en el desarrollo de síndrome metabólico. ACC, acetil-CoA carboxilasa; ACS, acil-CoA sintasa; AGL, ácidos grasos libres; AMPD, AMP desaminasa; AP-1, proteína activadora 1; CAT1, carnitina aciltransferasa 1; ChREBP, proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; CL, citrato liasa; CS, citrato sintasa; DAG, diacilglicerol; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; ERO, especies reactivas de oxígeno; FK, fructocinasa; GA3P, gliceraldehído 3-fosfato; GLUT, transportador de glucosa; GK, gliceraldehído cinasa; GNG, gluconeogénesis; IRS, sustrato del receptor insulínico; JNK-1, cinasa c-Jun terminal; LDH, lactato deshidrogenasa; NOSe, óxido nítrico sintasa endotelial; PDH, piruvato deshidrogenasa; PGC1- $\beta$ , coactivador 1 $\beta$  del receptor activado gamma del proliferador de peroxisomas; PKC $\epsilon$ , proteína cinasa C tipo  $\epsilon$ ; Ser, serina; SREBP1, proteína 1c de unión al elemento de respuesta a esteroides; TG, triglicéridos; Thr, treonina; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

#### 4.2 Papel de la grasa en el síndrome metabólico

El exceso de grasa en la dieta conduce a una sobrecarga de TG en los adipocitos que desencadena inflamación del tejido adiposo y el depósito ectópico de lípidos. Como se ha explicado anteriormente, este almacenamiento de lípidos en el músculo produce resistencia a la insulina y favorece la inflamación y el estrés oxidativo que también son responsables del desarrollo del SM<sup>53,80</sup>. La ingesta elevada de grasas saturadas también conduce a la acumulación de lípidos en el hepatocito favoreciendo el desarrollo de EHGA. A diferencia de lo que ocurriría con la ingesta elevada de fructosa, una dieta rica en grasa parece inhibir la biosíntesis de novo de lípidos, por lo que en este caso, la reesterificación de los ácidos grasos procedentes de la dieta o del tejido adiposo estaría detrás del depósito hepático de TG<sup>81,82</sup>. Por el contrario, se ha visto que los ácidos grasos poliinsaturados tienen un papel beneficioso en este sentido, pues aunque estimulan la síntesis de novo de ácidos grasos reducen el estrés oxidativo<sup>83</sup>. Las grasas saturadas también activan la vía de señalización que implica a JNK. Esto contribuye al desarrollo de esteatosis hepática y de resistencia a la insulina así como a la liberación de citocinas y la activación de macrófagos<sup>84</sup>. También producen estrés del retículo endoplásmico e inducen estrés oxidativo<sup>85</sup>.

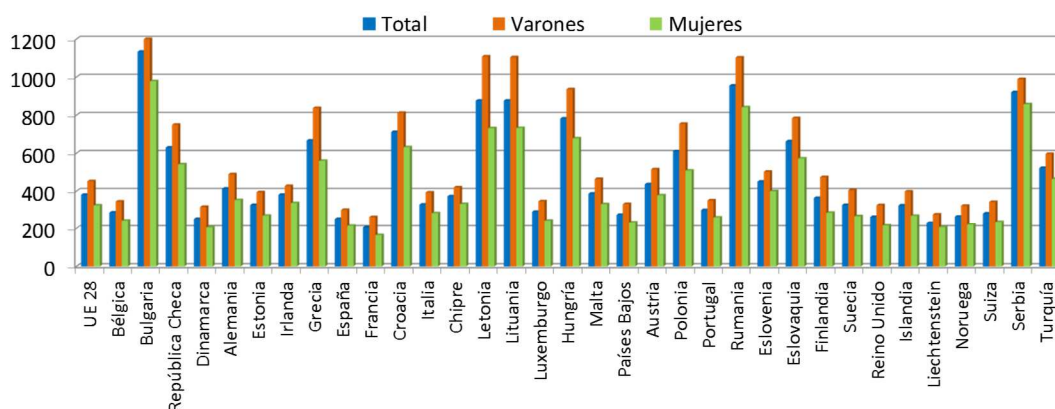
Se han propuesto otros mecanismos que explican el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas producidas por una dieta rica en grasa. Un consumo elevado de grasas aumenta la ingesta por su menor efecto saciante y produce alteraciones en las hormonas implicadas en la homeostasis energética. Una dieta alta en grasa induce hiperleptinemia e hiperinsulinemia, así como resistencia a la leptina

y a la insulina y disminución de la liberación de grelina (hormona anorexígena). Por otra parte, el organismo presenta una elevada eficiencia para almacenar las grasas ingeridas<sup>86</sup>.

## 5. Implicación del síndrome metabólico en enfermedades cardiovasculares y hepáticas

Las últimas estadísticas publicadas en 2018 por la OMS destacan que las ECV continúan siendo la principal causa de muerte en el mundo, responsables en 2016 de 17,9 millones de muertes y representando el 31% del total de fallecimientos<sup>87</sup>.

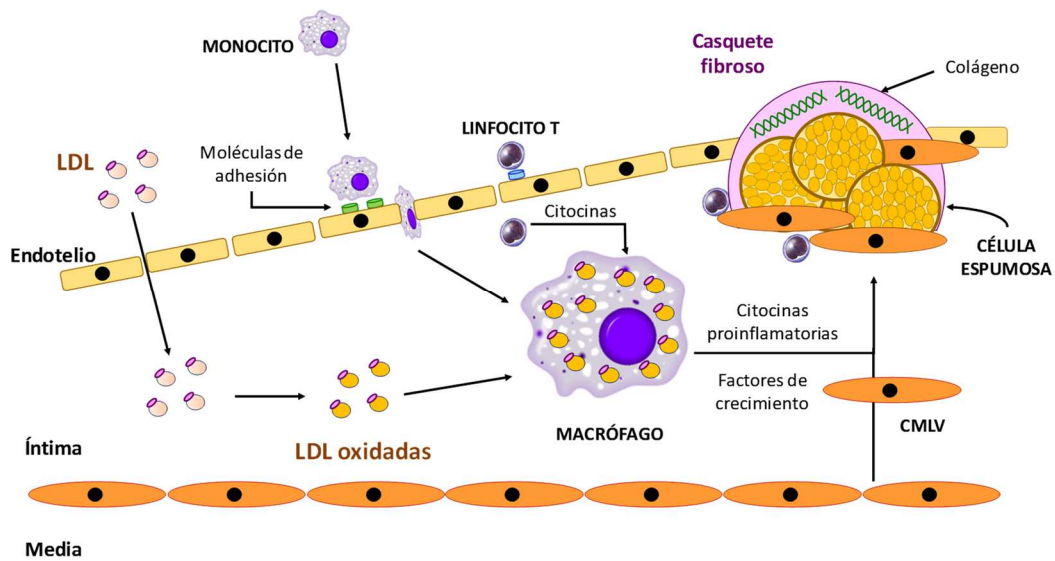
En España, los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística en 2018 muestran que estas patologías también constituyen la primera causa de muerte (28,3% de las defunciones) y presentan una morbilidad elevada. Por sexo, las enfermedades del sistema circulatorio fueron la primera causa de mortalidad femenina (272 muertes por cada 100.000 habitantes) y la segunda entre los hombres (244) por detrás de los tumores (298). La principal causa de muerte cardiovascular en la mujer es el ictus mientras que en varones es la cardiopatía isquémica<sup>88</sup>. Si comparamos con nuestro entorno europeo España está por debajo de la media de la Unión Europea en defunciones debidas a enfermedades del sistema circulatorio (figura 7)<sup>89</sup>.



**Figura 7.** Defunciones por cada 100.000 habitantes debidas a enfermedades del sistema circulatorio en países europeos (datos tomados de la Oficina Europea de Estadística –Eurostat– correspondientes a 2017).

El conocimiento de los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) es fundamental a la hora de instaurar una prevención más eficiente y reducir la incidencia de ECV. Los principales FRCV son: hipertensión, tabaquismo, dislipemia, obesidad, DM y sedentarismo<sup>90</sup>. Cabe destacar que estos factores son parámetros que definen el SM, de ahí su repercusión en el desarrollo y progresión de ECV. Los FRCV se pueden corregir o eliminar con modificaciones en el estilo de vida aunque en ocasiones es necesario incorporar un tratamiento farmacológico para su control. También existen marcadores de riesgo, que son inherentes a la persona y aumentan las probabilidades de desarrollar la enfermedad, pero no se pueden corregir ni actuar sobre ellos como la edad, el sexo o la historia familiar.

El SM tiene un papel importante en la fisiopatología de la aterosclerosis que consiste en la acumulación en la capa íntima de las arterias de material lipídico y células que contribuyen a la formación de la placa de ateroma, provocando la obstrucción de la luz vascular (figura 8)<sup>91</sup>. Es una de las principales causas de isquemia responsable de ECV de elevada morbimortalidad, como la cardiopatía isquémica o el ictus. La aterosclerosis está ligada a niveles elevados de colesterol en sangre especialmente al aumento de LDLc. Sin embargo, el desarrollo de la placa de ateroma es más complejo, implica una reacción inflamatoria vascular que se desarrolla frente a diversas situaciones lesivas para el vaso sanguíneo: hipertensión, DM, aumento de LDLc y obesidad, entre otros. Estos factores de riesgo, presentes en el SM, ocasionan disfunción del endotelio vascular. Dicha disfunción propicia la expresión de moléculas de adhesión, las cuales atraen células inflamatorias (monocitos, linfocitos T) y aumentan la permeabilidad vascular. Esto favorece el paso a la íntima de dichas células, así como de las LDLc que se oxidan. El exceso de LDLc hace que la captación a través de receptores apoB-100 se vea superada y se favorezca su depósito en la íntima arterial. Los monocitos se diferencian a macrófagos que captan las LDLc oxidadas y el colesterol que contienen. Los macrófagos no pueden limitar la captación de colesterol y se va acumulando formando las células espumosas que, a su vez, constituirán una placa rica en colesterol (estría grasa). Las LDLc oxidadas y las citocinas secretadas por los linfocitos T actúan sobre los macrófagos y las células espumosas que liberan citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF $\alpha$ ) y factores de crecimiento. Se produce la proliferación y migración hacia la íntima de células musculares y la acumulación de proteínas de la matriz extracelular. La placa de ateroma se puede romper y propiciar la formación de un trombo arterial dando lugar a un ictus o a un ataque al corazón<sup>92</sup>.



**Figura 8.** Representación esquemática de la formación y progresión de la placa de ateroma. LDL: lipoproteína de baja densidad; CMLV: célula de músculo liso vascular.

La relación del SM con un mayor riesgo de ECV y DM es clara<sup>93</sup>. El SM aumenta la morbimortalidad general pues también parece influir en el desarrollo y progresión de otras patologías tan variadas como: EHGNA, enfermedad renal crónica, síndrome del ovario poliquístico, alteraciones óseas y musculares, enfermedades respiratorias, demencia, cáncer, otras alteraciones endocrinas o enfermedad por reflujo gastroesofágico<sup>12</sup>.

Por otra parte, el SM también tiene un papel protagonista en el desarrollo de la EHGNA que se ha convertido en la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica en los países occidentales. En los próximos años se prevé un aumento de su incidencia como consecuencia del incremento de la obesidad y el SM. En Europa, la prevalencia estimada en la población adulta es del 25%, siendo significativamente superior en los pacientes con SM, particularmente en aquellos con obesidad y/o DM tipo 2. Por ejemplo, entre los pacientes con DM tipo 2 la prevalencia se estima en un 40-70%<sup>94</sup>. La EHGNA se caracteriza por un amplio espectro de lesiones hepáticas que se producen en ausencia de un consumo crónico de alcohol. Incluye la esteatosis hepática simple, que consiste en la acumulación hepática de grasa, y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que se trata de esteatosis asociada a cambios necroinflamatorios con grados variables de fibrosis. La EHNA puede evolucionar a

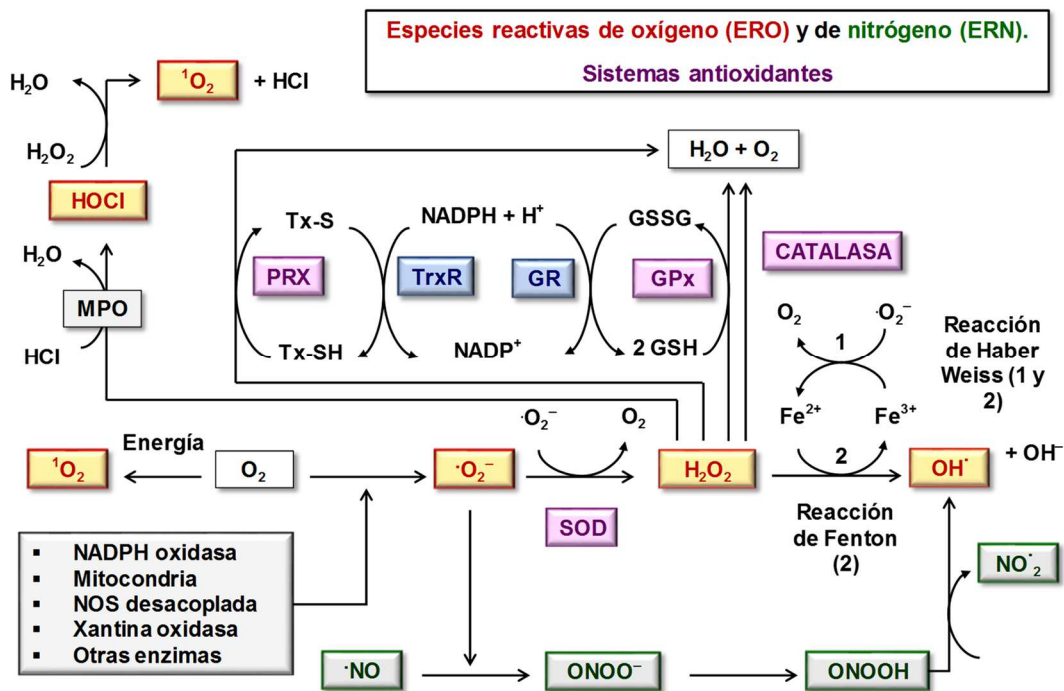
cirrosis hepática y aumenta el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma<sup>95</sup>. Uno de los principales mecanismos fisiopatológicos de la esteatosis hepática es la resistencia a la insulina. Como se ha descrito en apartados anteriores, la resistencia a la insulina en el tejido adiposo desencadena una lipólisis excesiva que aumenta la liberación de ácidos grasos libres con el consiguiente incremento de su captación hepática. El aumento de la lipógenesis hepática también contribuye al acúmulo de grasa en el hígado. El depósito hepático de ácidos grasos libres y TG induce la producción de radicales libres y citocinas que promueven un estado inflamatorio y el desarrollo de esteatohepatitis. Además, la alteración de la función secretora del tejido adiposo repercute en el desarrollo de EHGNA. En el contexto de obesidad y resistencia a la insulina aumenta la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6) y disminuye la producción y/o acción de adipocinas como la leptina o la adiponectina, hormona antiesteatósica que promueve la  $\beta$ -oxidación y es antiinflamatoria<sup>96</sup>.

## 6. Estrés oxidativo en el síndrome metabólico

El estrés oxidativo parece desempeñar un papel clave en varias enfermedades como patologías cardiovasculares, cáncer o diabetes<sup>97</sup>. Se puede definir como una situación de desequilibrio entre la producción de moléculas oxidantes frente a la capacidad antioxidante del organismo, a favor de las primeras.

La implicación de los radicales libres en diversas enfermedades se propuso por primera vez en la década de los 50, aunque cada vez existen más evidencias de que las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERON) no solo tienen un papel fisiopatológico sino que también participan en el mantenimiento de la homeostasis celular. Las ERON se producen de forma fisiológica como subproductos del metabolismo normal, influyen en varias vías de señalización celular y regulan diversos procesos celulares como diferenciación, proliferación, apoptosis, migración, secreción, activación de factores de crecimiento y expresión génica. Sin embargo, el aumento excesivo de la biodisponibilidad de dichas especies reactivas tiene efectos deletéreos. En los sistemas biológicos existe una defensa natural compuesta por sistemas enzimáticos y no enzimáticos que actúan de forma coordinada para mantener dichas especies en valores adecuados (figura 9)<sup>98</sup>.





**Figura 9.** Formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Sistemas biológicos de defensa antioxidante. GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxido de hidrógeno; HOCl, ácido hipocloroso; MPO, mieloperoxidasa; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NO, óxido nítrico;  $\text{NO}_2$ , radical dióxido de nitrógeno; NOS, óxido nítrico sintasa;  $^1\text{O}_2$ , oxígeno singlete;  $\cdot\text{O}_2^-$ , anión superóxido;  $\text{OH}^-$ , anión hidroxilo;  $\text{OH}^\cdot$ , radical hidroxilo; ONOO<sup>-</sup>, anión peroxinitrito; PRX, peroxirredoxina; SOD, superóxido reductasa; Tx, tioredoxina; TrxR, tioredoxina reductasa.

En la naturaleza existen ERO, de nitrógeno (ERN), de cloro, de bromo, etc. Incluyen no sólo radicales libres, especies químicas que presentan uno o más electrones desapareados en el orbital más externo, sino también otras moléculas oxidantes o que pueden convertirse fácilmente en radicales. Las ERO y las ERN son los dos grandes grupos de especies reactivas implicadas en la biología redox. Las ERO derivan del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y comprenden radicales libres, iones de oxígeno y peróxidos, tanto orgánicos como inorgánicos. Las principales ERO son anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ). El NO<sup>·</sup> y el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) son las ERN más relevantes<sup>99</sup>.

## 5.1 Producción de ERO

Las ERO se pueden generar en cualquier compartimento celular (mitocondria, retículo endoplásmico, citosol...). Los cardiomiocitos y todos los tipos de células vasculares (endoteliales, músculo liso vascular, fibroblastos, adipocitos perivasculares) producen especies oxidantes. Los macrófagos y células T también generan ERO e inducen la producción vascular de las mismas. El  $\cdot\text{O}_2^-$  procede de la reducción univalente del  $\text{O}_2$  y se puede generar por una gran variedad de procesos enzimáticos y no enzimáticos.

La **mitocondria** constituye una de las principales fuentes de producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ . El 1-2% del flujo de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial se transfiere al  $\text{O}_2$  para formar  $\cdot\text{O}_2^-$ . Este proceso tiene lugar fundamentalmente a nivel de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones aunque también están implicadas otras proteínas mitocondriales como p66<sup>Shc</sup>. El exceso de ERO produce disfunción mitocondrial involucrada en la fisiopatología del SM y en el desarrollo de disfunción endotelial<sup>98,100,101</sup>.

Una de las fuentes endógenas más importantes de  $\cdot\text{O}_2^-$  son las **NADPH oxidasas** (Noxs). Son proteínas transmembrana constituidas por una subunidad catalítica (Nox) y una serie de subunidades reguladoras. Catalizan la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  mediante la reducción del  $\text{O}_2$  con un electrón usando el NADPH como donador de éste<sup>102</sup>.

Se han descrito 7 isoformas: Nox 1-5 y Duox 1 y 2. Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 se expresan en el sistema cardiovascular y están implicadas en la fibrosis y el remodelado cardíaco tras infarto de miocardio, la diabetes, la aterosclerosis o la hipertensión. En condiciones normales Nox2 es la principal fuente de ERO en las células endoteliales y en condiciones patológicas aumenta la expresión de Nox1 y Nox4. La expresión de Noxs aumenta en respuesta a estímulos mecánicos, factores de crecimiento, citocinas, factores metabólicos y diversas moléculas vasoactivas (trombina, bradicinina, endotelina 1)<sup>103-106</sup>.

La **óxido nítrico sintasa** cataliza la formación de citrulina y NO a partir de L-arginina. El NO es uno de los mediadores clave en el mantenimiento de la homeostasis de la función endotelial, es vasodilatador, antiagregante plaquetario, disminuye la permeabilidad vascular e inhibe la proliferación celular. Existen tres isoformas: endotelial y neuronal que se expresan de forma constitutiva e inducible<sup>107</sup>. En determinadas circunstancias se puede producir el desacoplamiento de la NOS

siendo la causa principal la disminución de su cofactor  $\text{BH}_4$  (tetrahidrobiopterina). Cuando la NOS está desacoplada se forma  $\cdot\text{O}_2^-$  en lugar de  $\text{NO}\cdot$ . Además, el  $\cdot\text{O}_2^-$  reacciona con el  $\text{NO}\cdot$  y forma  $\text{ONOO}^-$  que puede oxidar a su vez a  $\text{BH}_4$ . En definitiva, el desacoplamiento de la NOS disminuye la biodisponibilidad del  $\text{NO}\cdot$  (disminuye la síntesis y aumenta la degradación), alterando la función cardiovascular<sup>108</sup>.

La **xantina oxidasa (XO)** es una forma de xantina oxidoreductasa que cataliza primero la oxidación de hipoxantina a xantina y, después, la oxidación de xantina a ácido úrico. En condiciones normales la enzima se encuentra en su forma deshidrogenasa pero bajo determinadas condiciones como hipoxia predomina la forma oxidada que genera  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Está implicada en la formación de ERO en el proceso de isquemia-reperfusión. La NADPH oxidasa, y en consecuencia los factores que la regulan, aumentan la actividad y la expresión de XO<sup>109</sup>.

Existen otras enzimas que también están implicadas en la formación de ERO en el sistema cardiovascular<sup>110</sup>:

- **Lipoxigenasas.** Son enzimas implicadas en la biosíntesis de leucotrienos, mediadores que juegan un papel importante en la inflamación.
- **Mieloperoxidasas.** Pertenecen a la familia de las hemoperoxidasas y generan especies oxidantes (como  $\text{HOCl}$ ) a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Existen evidencias de su implicación en ECV<sup>111</sup>. En humanos se ha visto que pacientes con niveles bajos de mieloperoxidasas presentan un menor riesgo cardiovascular.

## 5.2 Reducción del $\cdot\text{O}_2^-$ y formación de otras especies reactivas

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es otra especie reactiva pero no es un radical libre. Se produce principalmente por la dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$  por la superóxido dismutasa (SOD). También se puede formar por la reducción directa del  $\text{O}_2$  por 2 electrones o a partir de otros sistemas enzimáticos como la Nox4. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es más estable que el  $\cdot\text{O}_2^-$  y es capaz de atravesar las membranas celulares a través de las acuoporinas<sup>98</sup>.

El  $\text{OH}\cdot$  es una de las especies oxidantes más reactivas que se conocen. Se puede formar por la ruptura del  $\text{H}_2\text{O}_2$  debido a la acción de la luz ultravioleta y a través de la reacción de Fenton, catalizada por los cationes  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ . En ella, el  $\text{Fe}^{2+}$  es capaz de descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en anión hidroxilo y  $\text{OH}\cdot$ . La reacción de Fenton se combina con la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  por el  $\cdot\text{O}_2^-$  para regenerar el  $\text{Fe}^{2+}$ . El conjunto de estas reacciones se engloba en lo que se conoce como reacción de Haber-Weiss. El

NO y el  $\cdot\text{O}_2^-$  reaccionan para dar una molécula muy oxidante, el ONOO $\cdot$ . Este puede reaccionar con un radical de hidrógeno para formar el peroxinitroso (ONOOH), más estable. ONOOH se dismuta rápidamente en otras ERN (NO $_2$ ) y OH $\cdot$ <sup>98</sup>.

Las ERON juegan un papel fundamental en la homeostasis celular. Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo se produce daño celular resultado de la interacción de las ERON con lípidos, proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos que altera la estructura y funcionalidad de dichas biomoléculas.

### **5.3 El estrés oxidativo en la fisiopatología de la disfunción endotelial y del síndrome metabólico**

Las ERON juegan un papel fundamental en la homeostasis vascular y metabólica participando, por ejemplo, en el control de la función endotelial o en la acción de la insulina. Intervienen en varias vías de señalización mediante modificaciones postraduccionales de diversas proteínas que incluyen oxidación, hidroxilación o nitración de aminoácidos. Los cambios producidos en las proteínas dan lugar a alteraciones en su conformación, estabilidad y actividad así como en su capacidad para interactuar con otras proteínas. De esta forma, las ERON, a concentraciones fisiológicas, participan en la regulación de la función celular. Entre las proteínas sensibles a los cambios redox encontramos: proteínas que participan en la homeostasis del calcio, proteínas contráctiles, MAPK, tirosina cinasas, proteínas G monoméricas (Ras, Rac1, RhoA), tirosina fosfatasas, factores de transcripción, histona desacetilasas, etc<sup>98</sup>.

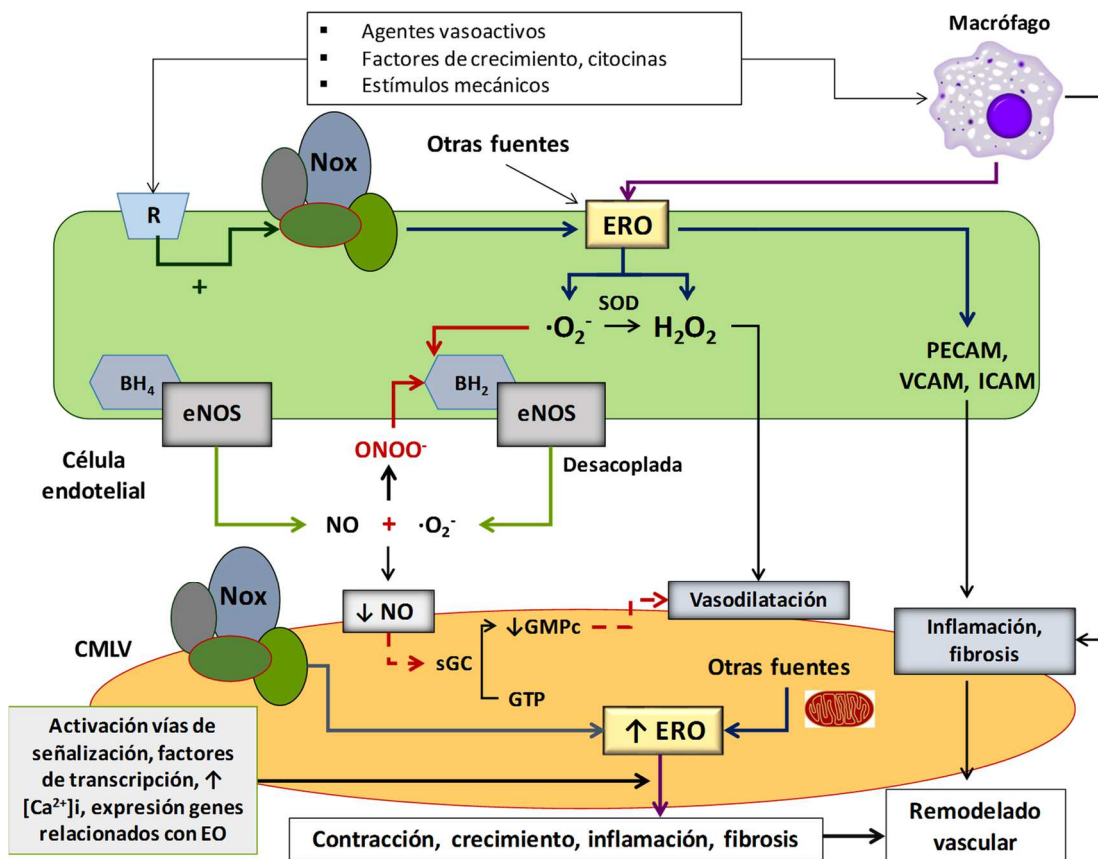
Sin embargo, el estrés oxidativo influye en el desarrollo y progresión de diversas patologías mediante la activación persistente de determinadas vías de señalización. El aumento de  $\cdot\text{O}_2^-$  y H $_2\text{O}_2$  ocasiona una sobreestimulación de MAPK, tirosina cinasas, Rho cinasas y factores de transcripción e inactivan tirosina fosfatasas. Además, inducen la expresión y actividad de protooncogenes y genes proinflamatorios<sup>112,113</sup>.

Especial atención merece la relación entre estrés oxidativo e inflamación, procesos íntimamente ligados. Como ya hemos comentado, el tejido adiposo durante la obesidad desencadena la infiltración y activación de macrófagos. Los macrófagos activados liberan citocinas inflamatorias como el TNF $\alpha$  que estimula la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ . A su vez, el incremento de ERO favorece la activación de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes proinflamatorios (TNF $\alpha$ ,

IL-6, moléculas de adhesión, NOSi, ciclooxigenasa-2). Esto da lugar a un cierto grado de inflamación crónica que promueve la formación de ERO cerrando el círculo vicioso<sup>113-115</sup>.

Los diferentes mecanismos descritos determinan que, en condiciones patológicas, las ERO estén implicadas en la inflamación, disfunción endotelial, fibrosis, angiogénesis, remodelado vascular, agregación plaquetaria, depósito de matriz extracelular y proliferación, migración y activación celular (figura 10). Estos procesos son los responsables del daño vascular y el remodelado estructural que aparece en las patologías cardiovasculares<sup>106,112</sup>.

El estrés oxidativo y el estado inflamatorio también tienen un papel clave en el desarrollo y progresión del SM. Alteran la cascada de señalización de la insulina y contribuyen al desarrollo de resistencia insulínica. Por un lado, se inactiva la vía PI3K/AKT suprimiendo los efectos anabólicos de la insulina y disminuyendo la captación de glucosa al impedir la translocación a la membrana del transportador GLUT4. Por otro lado, predomina la vía de las MAPK que se caracteriza por estimular el crecimiento, proliferación y migración celular<sup>116</sup>. Además, las ERO afectan a las células  $\beta$  pancreáticas que son muy sensibles al estrés oxidativo. La disfunción de estas células contribuye a la aparición de diabetes. Las ERO también favorecen la oxidación de las LDLc, que como ya comentamos, tienen un papel protagonista en el desarrollo de aterosclerosis<sup>117</sup>. Además, la hiperglucemia facilita la glicación no enzimática de proteínas y lípidos dando lugar a la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) y productos finales de lipoxidación avanzada (ALEs). La interacción de los AGEs con los receptores RAGE, receptores de la superfamilia de receptores de inmunoglobulinas, promueve la producción de ERO y la activación de NF- $\kappa$ B. Los AGEs contribuyen, por tanto, a las alteraciones metabólicas y los daños vasculares característicos de la diabetes<sup>118</sup>.



**Figura 10.** Mecanismos mediados por ERO que contribuyen en los cambios vasculares asociados con la disfunción endotelial (adaptado de referencia Montezano AC y colaboradores<sup>119</sup>). BH<sub>2</sub>, dihidrobiopterina; BH<sub>4</sub>, tetrahydrobiopterina; CMLV, célula de músculo liso vascular; EO, estrés oxidativo; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; ERO, especies reactivas de oxígeno; sGC, guanilato ciclasa soluble; NO, óxido nítrico; ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anión superóxido; OH·, radical hidroxilo; ONOO·, anión peroxinitrito; SOD, superóxido dismutasa.

#### 5.4 Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo

En los sistemas biológicos, la defensa natural frente a las ERO comprende sistemas enzimáticos y no enzimáticos que actúan de forma coordinada. Entre las principales enzimas antioxidantes se incluyen: SOD, catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y peroxirredoxina (PRx). Otras enzimas que participan en la defensa antioxidante son las implicadas en el metabolismo de glutatión (glutatión S-

transferasa,  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa y glutatión reductasa) o la tiorredoxina reductasa que regenera la tiorredoxina.

La SOD cataliza la dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ . La catalasa se localiza fundamentalmente en los peroxisomas y cataliza la conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . La GPx promueve la degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otros peróxidos, mediante el empleo de glutatión reducido dando lugar a  $\text{H}_2\text{O}$  y glutatión oxidado. La PRx también es una peroxidasa que reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  en un sistema redox en el que la tiorredoxina aporta los electrones<sup>106,120</sup>.

El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es el principal factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de numerosos genes de enzimas antioxidantes<sup>121</sup>. Es posible que la expresión de Nrf2 esté reducida en determinadas enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Sin embargo, el papel de Nrf2 es controvertido pues algunos estudios han relacionado la activación de este factor de transcripción con la resistencia a la insulina. Una posible explicación es que la activación de Nrf2 podría anular la producción de EROn que son imprescindibles para la homeostasis metabólica en pequeñas cantidades<sup>122</sup>.

Los antioxidantes no enzimáticos son compuestos que neutralizan las ERO. Pertenecen a este grupo las vitaminas A, C y E, GSH, bilirrubina y ácido úrico, además de los carotenoides. También son importantes para el correcto balance redox otros micronutrientes como zinc, cobre, manganeso, hierro o selenio.

## 7. Tratamiento del síndrome metabólico

La prevención es la mejor herramienta para evitar el desarrollo o progresión del SM. Impulsar actividades de educación sanitaria, fomentar hábitos de vida saludables e implantar programas de diagnóstico precoz reducirían significativamente su impacto tanto a nivel sanitario como económico. Algunas recomendaciones para reducir su elevada incidencia son: evitar el sedentarismo, seguir una dieta baja en grasas y azúcares sencillos, controlar el peso corporal y abandonar hábitos nocivos como el tabaco<sup>123</sup>. Sin embargo, en ocasiones, por falta de adherencia o porque esas medidas de prevención resultan insuficientes es necesario recurrir a tratamientos farmacológicos para controlar los parámetros alterados que definen el SM y, así, reducir el riesgo de desarrollar ECV o DM<sup>12</sup>. La intervención con alimentos funcionales o suplementos dietéticos es una opción muy interesante para prevenir el desarrollo de determinadas patologías y factores de

riesgo (hipertensión, diabetes, obesidad, etc.) y mejorar la calidad de vida de la población<sup>124</sup>. Es bien conocido que las sustancias antioxidantes pueden resultar útiles en la prevención y el tratamiento de dichas alteraciones. Algunas de estas sustancias, como los flavonoides o los carotenoides, son de origen natural y las podemos encontrar en nuestra dieta<sup>125,126</sup>.

## 8. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos orgánicos terpénicos. Se caracterizan por presentar, generalmente, una estructura de 40 átomos de carbono construida a partir de la unión de ocho unidades isoprénicas. El sistema de dobles enlaces conjugados característico de los carotenoides es el responsable de su coloración amarillo-anaranjada y de su enorme sensibilidad a la oxidación. Los carotenoides se dividen en dos grandes grupos: carotenos, cuando la molécula es un hidrocarburo, y xantofilas, si poseen una o más funciones oxigenadas. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son responsables del intenso color de diversas frutas, flores, aves, peces y crustáceos<sup>127</sup>.

Hasta la fecha se han caracterizado más de 750 carotenoides. Se sintetizan *de novo* por plantas, algas y algunas bacterias fotosintéticas, se acumulan en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos, tienen un papel clave en la fotosíntesis y ejercen un efecto fotoprotector frente a radiaciones nocivas. Los animales no son capaces de sintetizar carotenoides y, puesto que se trata de compuestos esenciales para el correcto mantenimiento de la homeostasis en el organismo, es necesario que los incorporen a partir de la dieta. Son precursores de la vitamina A y constituyen su principal fuente de obtención aunque no todos tienen acción provitamínica A en humanos<sup>128</sup>.

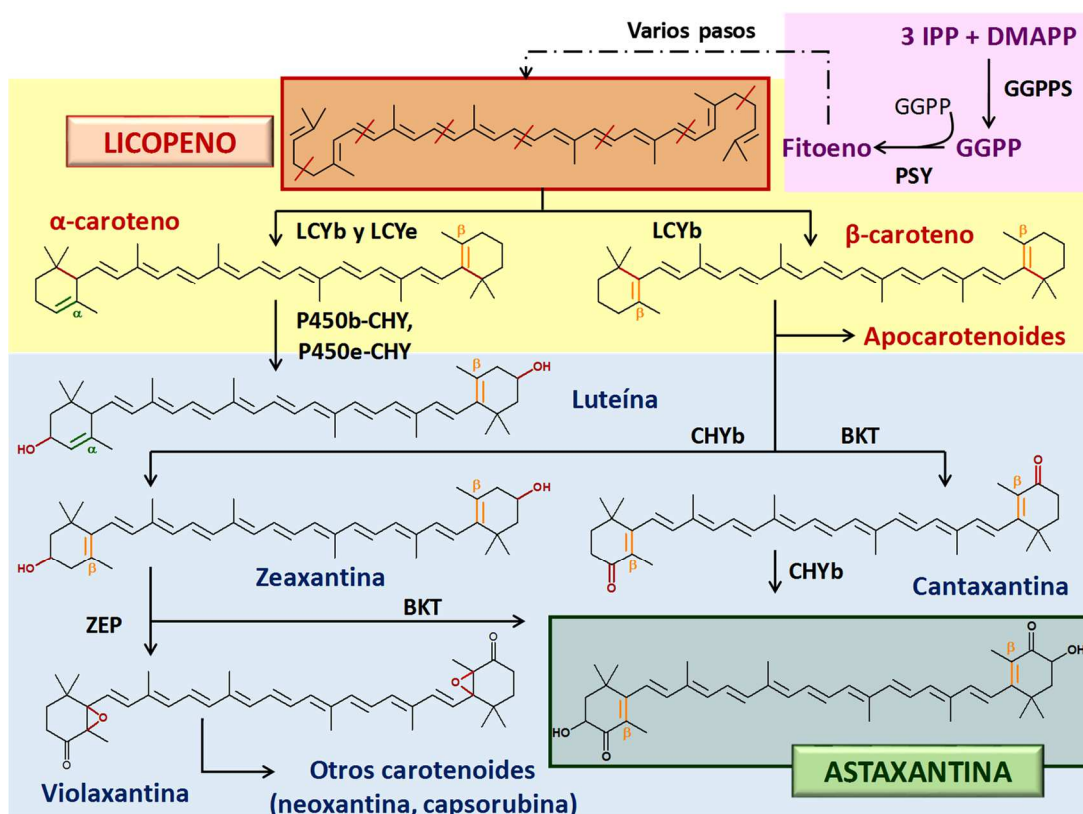
Una de las características de los carotenoides que ha adquirido un interés creciente en los últimos años es su capacidad antioxidante. Aunque todavía quedan muchas incógnitas en cuanto al papel del estrés oxidativo como agente etiopatogénico y en relación al mecanismo de acción y eficacia antioxidante de los carotenoides, numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren un papel protector de estos compuestos frente al estrés oxidativo asociado a distintas enfermedades crónicas y degenerativas<sup>129</sup>.

Tradicionalmente, los carotenoides han recibido nombres triviales derivados de las fuentes naturales de las que se aislaron por primera vez aunque la IUPAC



desarrolló en 1974 una nomenclatura semisistemática<sup>130</sup>. La estructura patrón de 40 átomos de carbono se denomina caroteno. Este término va precedido de la letra griega que designa la estructura de los extremos del caroteno y cuando el carotenoide presenta actividad óptica la quiralidad se indica con el sistema convencional R/S.

Biosintéticamente, los carotenoides se forman por condensación cola-cola de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Se obtiene pirofosfato de prefitoeno y, posteriormente, se forma el hidrocarburo 15,15' insaturado, el fitoeno. El fitoeno se desatura de manera progresiva en fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno y, finalmente, se forma el licopeno. Estos compuestos contienen 5, 7, 9 y 11 dobles enlaces conjugados, respectivamente. El incremento en el número de dobles enlaces conjugados incrementa la longitud de onda que es capaz de absorber este grupo cromóforo dando al compuesto un color más rojizo. A partir del licopeno se forman el resto de carotenoides. Las extremidades insaturadas pueden ciclarse tras la protonación del doble enlace terminal y, posteriormente, los compuestos formados pueden oxidarse, epoxidarse o, incluso, degradarse parcialmente (figura 11)<sup>131</sup>.



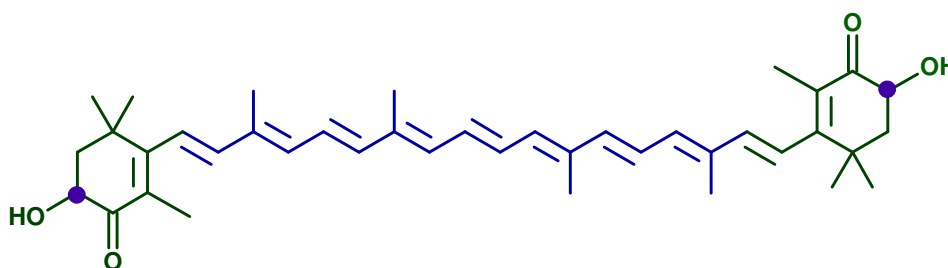
**Figura 11.** Biosíntesis de carotenoides en plantas y microalgas. IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; GGPPS, geranilgeranil pirofosfato sintasa; PSY, fitoeno sintasa; LCYb, licopeno β-ciclase; LCYe, licopeno ε-ciclase; P450b-CHY, citocromo P450 β-hidroxilasa; P450e-CHY, citocromo P450 ε-hidroxilasa; CHYb, caroteno β-hidroxilasa; BKT, β-caroteno oxigenasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa.

## 9. Astaxantina

La astaxantina es una xantofila u oxicarotenoide (3,3'-dihidroxi-β,β-caroteno-4,4-diona) presente en numerosos organismos fundamentalmente de origen marino como microalgas, plancton, crustáceos y peces<sup>132</sup>. Es un pigmento rojo liposoluble responsable de la coloración característica del salmón, la trucha y distintos crustáceos, como la langosta o el camarón. También está presente en hongos, plantas y aves como el flamenco y la codorniz. Aunque de forma limitada, solo los crustáceos son capaces de transformar los carotenoides de la dieta en astaxantina. En 1987, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó su empleo como colorante alimenticio

en la acuicultura<sup>133</sup>. En las últimas décadas ha adquirido un notable interés por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que podrían hacer pensar en su utilidad potencial en el tratamiento y prevención de distintas alteraciones y, de manera especial, de las enfermedades cardiovasculares. De hecho, en 1999 se aprobó su uso como suplemento dietético (nutracéutico).

Estructuralmente, la astaxantina está constituida por la cadena de dobles enlaces característica de los carotenoides y por un anillo terminal  $\beta$ -ionona hidroxilado en cada extremo de la cadena poliénica (figura 12). Estas funciones oxigenadas confieren a la astaxantina una mayor polaridad y poder antioxidante que otros carotenoides (como el  $\beta$ -caroteno o el licopeno) pues no se limita sólo a sus dobles enlaces conjugados. Tiene 2 carbonos asimétricos (posiciones 3 y 3') por lo que existen 4 posibles estereoisómeros: (3S, 3'S) y (3R, 3'R) que son enantiómeros, y las formas meso (3R, 3'S) y (3S, 3'R) que son idénticas debido a la simetría de la molécula. También es posible la presencia de distintos isómeros geométricos debido a los numerosos enlaces conjugados de la cadena poliénica. El isómero lineal todo trans (E) es el más frecuente en la naturaleza aunque también encontramos formas Z, debido a la isomerización E-Z. El grupo hidroxilo de los anillos terminales puede reaccionar con ácidos grasos dando lugar a mono y diésteres. Así, en la naturaleza se puede encontrar en forma libre (más susceptible a la oxidación) o esterificado, predominando esta última. También puede estar conjugada con proteínas como en el exoesqueleto de los crustáceos<sup>132</sup>.



**Figura 12.** Estructura química de la astaxantina.

La principal fuente de obtención de astaxantina es la microalga unicelular *Haematococcus pluvialis*. Otras fuentes empleadas en la producción comercial de astaxantina son cultivos de *Euphausia pacifica* (crustáceo del Pacífico), *Euphausia superba* (crustáceo de la Antártida), *Pandalus borealis* (camarón) y *Xanthophylomyces*

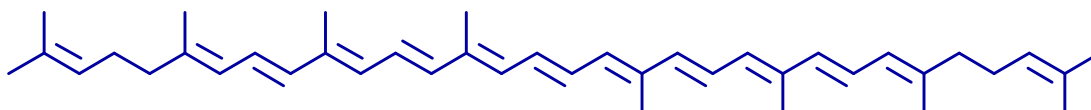
*dendrourous* (levadura). También existen algunos preparados sintéticos como el DDA (disodium disuccinate astaxanthin) que es una mezcla de los esteroisómeros (3R, 3'R), (3R, 3'S) y (3S, 3'S) en una proporción 1:2:1, respectivamente. Este preparado, sintetizado por *Cardax Pharmaceuticals*, se ha empleado en estudios experimentales con modelos animales de isquemia-reperfusión. Presenta una mayor solubilidad acuosa y, a diferencia de otros carotenoides, se puede administrar tanto por vía oral como por vía intravenosa. Esta empresa ha desarrollado otro preparado, CDX-085, que está bajo patente y parece presentar una mayor solubilidad acuosa y mayor biodisponibilidad que DDA y la astaxantina natural. Estas formas sintéticas son profármacos que, si la administración es oral, se hidrolizan en el intestino dando lugar a la forma libre que es la que se absorbe<sup>134</sup>.

La biodisponibilidad oral de la astaxantina es baja debido a su escasa solubilidad en los fluidos gastrointestinales<sup>135</sup>. La absorción aumenta cuando se ingiere con grasa u otros lípidos gracias a la secreción de sales biliares y la formación de micelas para emulsionar los compuestos lipídicos. La absorción intestinal se produce por difusión simple aunque también se ha propuesto un transporte facilitado mediado por el SR-B1<sup>136</sup>. La astaxantina se ha detectado en todas las lipoproteínas plasmáticas por lo que su transporte y distribución están estrechamente relacionados con el metabolismo de las lipoproteínas. Aunque no se dispone de información en humanos, estudios en modelos animales han demostrado que la astaxantina se acumula en diversos tejidos como intestino, tejido adiposo, hígado, corazón o cerebro. A nivel celular, la naturaleza hidrófoba de la astaxantina sugiere que se dispone en las membranas celulares tanto plasmáticas como intracelulares<sup>137</sup>. En humanos, la astaxantina se metaboliza a 3-hidroxi-4-oxo- $\beta$ -ionona y 3-hidroxi-4 $\beta$ -ionona<sup>138</sup>. Aunque no se han evaluado los efectos biológicos de los metabolitos se ha sugerido que, dado que la actividad antioxidante de la astaxantina se debe a su estructura característica, no serían activos. En ratas, se ha determinado que después de la administración de astaxantina por vía intravenosa (5, 10 y 20 mg/kg) y oral (100 y 200 mg/kg) los parámetros farmacocinéticos son dosis-dependientes y dosis-independientes, respectivamente. Además, parece que existe un intenso efecto de primer paso hepático. La eliminación se produce fundamentalmente por vía biliar<sup>139</sup>.

## 10. Licopeno

El licopeno es un caroteno de color rojo que se encuentra en algunas frutas y verduras. El tomate, especialmente la piel, y sus derivados son las principales fuentes de licopeno. En general, los tomates contienen entre 3 y 5 mg de licopeno por 100 g de material crudo aunque este contenido depende de la variedad, características del cultivo y condiciones de conservación<sup>140</sup>. Otras fuentes de licopeno son la sandía, la guayaba rosa, el pimiento rojo y la papaya. Es el carotenoide más abundante en la dieta constituyendo el 50% de los carotenoides presentes en plasma. Los niveles plasmáticos de licopeno varían en función de la dieta estudiada; el norte y oeste de Europa y América son las regiones con un menor consumo de licopeno mientras que Asia y África central son las zonas donde la ingesta es mayor<sup>141</sup>.

Estructuralmente, el licopeno es un carotenoide acíclico constituido por una cadena hidrocarbonada con 11 dobles enlaces conjugados y 2 dobles enlaces no conjugados (figura 13)<sup>142</sup>. No tiene actividad provitamínica y carece de anillo  $\beta$ -ionona. El isómero geométrico todo trans o E es el más frecuente en la naturaleza aunque puede sufrir isomerización dando lugar a formas Z. Teóricamente, cada doble enlace de la cadena poliénica puede sufrir isomerización Z-E aunque no todos los dobles enlaces son susceptibles debido al impedimento estérico. La exposición a la luz, la digestión y el calor favorecen la isomerización Z-E<sup>143</sup>.



**Figura 13.** Estructura química del licopeno.

La biodisponibilidad oral del licopeno es baja pero es mayor para los productos derivados del tomate que para el tomate crudo pues el cocinado o procesado favorece la liberación del carotenoide de las estructuras tisulares y celulares en las que se encuentra en el alimento. En la absorción intestinal, que aumenta en presencia de alimentos grasos y está favorecida para los isómeros Z, destaca la participación de los receptores SR-B1 y CD36<sup>141,144</sup>. También se han identificado hasta 28 polimorfismos que pueden modificar la concentración plasmática del licopeno y sus efectos biológicos<sup>145</sup>. Del mismo modo que la

astaxantina, el transporte y distribución del licopeno se realiza a través de las lipoproteínas. La vida media del licopeno depende de la configuración de los dobles enlaces siendo de 5 días para la forma E y de 8 días para los isómeros Z<sup>146</sup>. Se metaboliza dando lugar a compuestos poliisoprenicos de menos de 40 átomos de carbono denominados licopenoides. Estos productos se obtienen por oxidación mediada por radicales libres o mediante enzimas (lipoxigenas, enzimas detoxificantes de fase II o monooxigenasas específicas de carotenoides) y algunos de estos metabolitos mantienen o mejoran sus propiedades beneficiosas<sup>147</sup>.

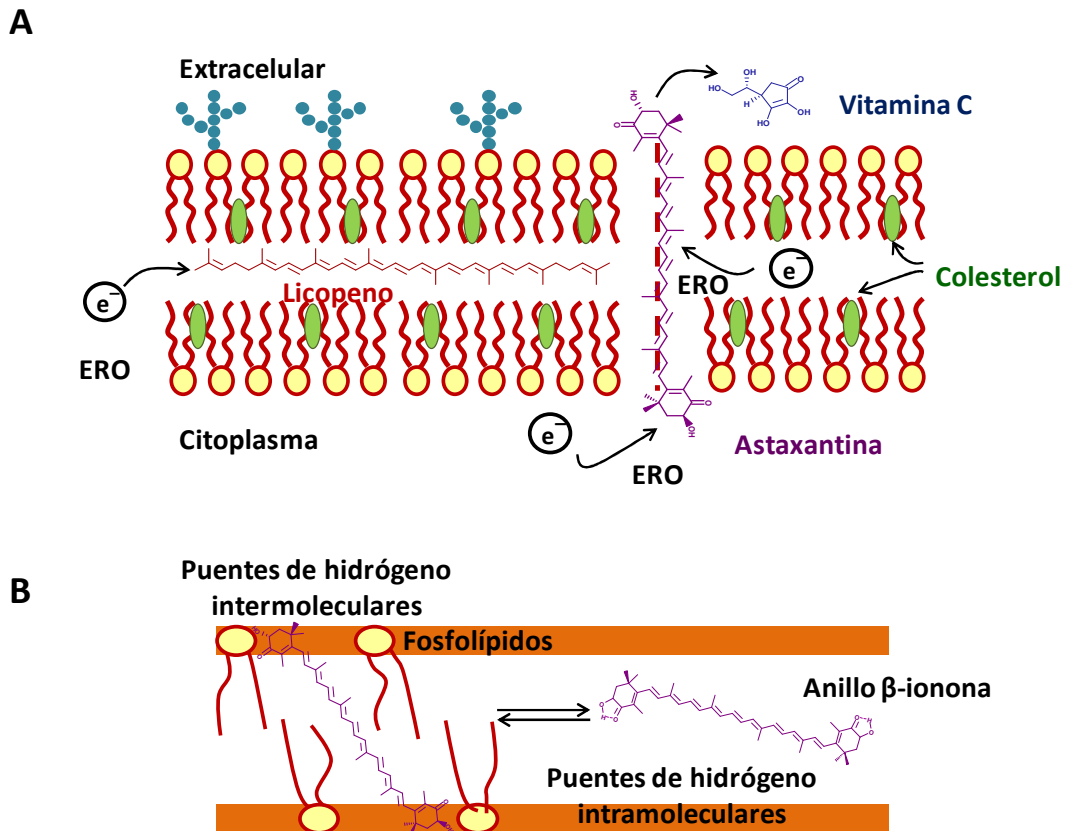
## **11. Acción antioxidante y antiinflamatoria de la astaxantina y del licopeno**

La actividad antioxidante de la astaxantina y del licopeno se ha demostrado en numerosos estudios en los que se ha puesto de manifiesto su acción *scavenger*, es decir, su capacidad para neutralizar radicales libres y otras especies oxidantes<sup>148,149</sup>.

Puesto que los carotenoides son liposolubles, su principal acción antioxidante se centra en las membranas biológicas. La localización e interacción de los carotenoides en las membranas biológicas depende de su estructura y de la composición de la membrana<sup>150</sup>. En este sentido, las diferencias estructurales entre los diversos carotenoides sugieren distintos tipos de interacción con la bicapa lipídica que repercuten en su fluidez y estabilidad. La astaxantina se dispone a lo largo de la membrana con sus grupos polares terminales orientados hacia fuera de la membrana. Así, el anillo de  $\beta$ -ionona hidroxilado se localiza en torno a la superficie de la membrana y la cadena poliénica en el interior<sup>151</sup>. Sin embargo, el licopeno se sitúa en el interior de la membrana adoptando una orientación paralela a la superficie de membrana (figura 14-A). Estas diferencias en la orientación y localización explican las diferencias de los carotenoides en la acción antioxidante y, en particular, en la peroxidación lipídica.

Se ha descrito que la astaxantina tiene mayor poder antioxidante que el licopeno pues interfiere en la propagación de los radicales libres a lo largo de la membrana y capta los radicales generados en su superficie. Además, se ha visto que, una vez que la astaxantina adopta su orientación favorable en la membrana, el anillo polar terminal es capaz de atrapar radicales tanto dentro como en la superficie de la membrana<sup>152</sup>. Esto se debe a la capacidad de las funciones oxigenadas (grupos cetona

e hidroxilo) para establecer puentes de hidrógeno intermoleculares con los grupos polares de los fosfolípidos y enlaces intramoleculares que incrementan la lipofilia de la astaxantina favoreciendo su localización en el interior de la membrana (figura 14-B). La cadena poliénica sólo capta radicales en el interior<sup>153</sup>.



**Figura 14.** Interacción de la astaxantina y del licopeno con las membranas celulares. **[A]** disposición de la astaxantina en las membranas celulares (adaptado de referencia 87). **[B]** capacidad del anillo  $\beta$ -ionona de establecer puentes de hidrógeno inter e intramoleculares (adaptado de Goto y colaboradores<sup>153</sup>).

Además de la actividad *scavenger*, se ha propuesto que la astaxantina y el licopeno aumentan la expresión y actividad de Nrf-2 que contribuye al efecto beneficioso sobre los niveles de enzimas antioxidantes<sup>154,155</sup>.

Sin embargo, varios estudios indican que, en determinadas circunstancias, algunos carotenoides presentan un efecto prooxidante. Este efecto paradójico puede explicarse por la elevada presión parcial de O<sub>2</sub>, concentración elevada del carotenoide o potencial de reducción elevado<sup>156</sup>. Por otra parte, se ha descrito un efecto sinérgico entre ácido ascórbico, α-tocoferol y carotenoides. Esta interacción permite la regeneración de los carotenoides pues tienen valores de potencial de reducción mayores que los correspondientes a las vitaminas E y C. Niveles bajos de estos últimos impiden la regeneración de los carotenoides oxidados convirtiéndose en agentes prooxidantes<sup>157</sup>.

Cabe destacar el efecto antiinflamatorio de la astaxantina y del licopeno que se debe, al menos en parte, a la inhibición de la activación de NF-κB<sup>148,158</sup>. Ambos carotenoides disminuyen la acumulación intracelular de ERO e impiden la activación de IκK (cinasa de NF-κB) responsable de la traslocación al núcleo de NF-κB. Así, reducen la expresión de factores proinflamatorios<sup>159,160</sup>. La astaxantina también ha logrado inhibir, en estudios *in vitro*, enzimas inflamatorias como la ciclooxigenasa 2 o la NOS<sup>161</sup>. Por su parte, el licopeno reduce la secreción de citocinas proinflamatorias, inhibe la proliferación de macrófagos y de células de músculo liso e inhibe la activación de linfocitos T<sup>162</sup>.

Tanto la astaxantina como el licopeno han mostrado efectos sobre la apoptosis que dependen de la patología. Por ejemplo, promueven la apoptosis en modelos de cáncer<sup>163,164</sup> y reducen la muerte de células ganglionares de la retina en la retinopatía diabética<sup>165</sup> o de cardiomiocitos en situación de isquemia<sup>166</sup>.

## 12. Potencial terapéutico de la astaxantina y del licopeno

Cada vez son más las evidencias que avalan el potencial de la astaxantina y del licopeno en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades como: cáncer, SM, diabetes, nefropatía diabética, ECV, patologías gastrointestinales y hepáticas, enfermedades neurodegenerativas, problemas de fertilidad, enfermedades oculares y cutáneas, etc<sup>167,162</sup>. La utilidad terapéutica de estos carotenoides se relaciona con su acción antioxidante y antiinflamatoria.

La actividad investigadora con astaxantina y licopeno es muy intensa y son numerosas las publicaciones relacionadas con estos carotenoides.



En distintos estudios preclínicos se ha comprobado que la astaxantina mejora y protege la función cardíaca, tiene efecto antitrombótico, mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, estabiliza la placa de ateroma, disminuye los niveles de colesterol y de TG en modelos de dislipemia, reduce la presión arterial en animales hipertensos y tiene actividad hepatoprotectora<sup>148</sup>. Sin embargo, la mayoría de ensayos clínicos se centran en estudios de biodisponibilidad, dosificación y seguridad y se llevan a cabo en sujetos sanos. Destacan dos ensayos realizados en pacientes con obesidad o sobrepeso, en los que la astaxantina redujo los marcadores de estrés oxidativo e inflamación y ralentizó el desarrollo de aterosclerosis<sup>168,169</sup>.

En relación al licopeno, los estudios realizados en animales para valorar su efecto a nivel cardiovascular son limitados. Sin embargo, son muchos los ensayos clínicos y estudios observacionales realizados con este caroteno, con resultados contradictorios. Algunos de los efectos beneficiosos que se han obtenido con el licopeno son: reducción de la incidencia de cardiopatía isquémica<sup>170</sup>, disminución de los niveles plasmáticos de LDLc<sup>171</sup>, reducción del engrosamiento de la íntima de la arteria carótida en pacientes con aterosclerosis subclínica<sup>172</sup>, mejora de la función endotelial<sup>173</sup>, reducción de la secreción de citocinas proinflamatorias<sup>174</sup>, disminución de la activación de macrófagos y linfocitos T<sup>175</sup> o reducción de los niveles de proteína C<sup>176</sup>. Parece que el consumo de alimentos que contienen licopeno es más eficaz que la administración de suplementos del carotenoide<sup>177</sup>. Sin embargo, algunos ensayos clínicos no han mostrado una relación favorable entre la ingesta de licopeno y la mejora de la salud cardiovascular<sup>162,178,179</sup>. Algunas razones que pueden explicar estos resultados negativos son: baja biodisponibilidad tras la administración oral, incapacidad para acceder a los lugares de formación de los radicales libres, variabilidad en las fuentes de obtención del licopeno, efectos irreversibles de las ERO, estudios con un número insuficiente de pacientes, incorporación a los ensayos de sujetos en los que no se evalúa la presencia de estrés oxidativo, falta de biomarcadores de estrés oxidativo clínicamente validados, variabilidad en los marcadores empleados o tiempo de tratamiento insuficiente. Conviene tener en cuenta que algunos ensayos clínicos realizados con otros antioxidantes (como vitamina E) también han dado resultados decepcionantes si consideramos los resultados prometedores de la investigación básica<sup>162,119</sup>. Esto sugiere que es necesario un diseño adecuado de los ensayos clínicos y conviene hacer estudios adicionales en animales para comprobar el efecto beneficioso de estos compuestos.



## **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**



En los últimos años, ha aumentado el interés por la utilización de alimentos funcionales y suplementos dietéticos en la prevención y tratamiento de las diferentes alteraciones características del SM. Una de las líneas de investigación de nuestro grupo es el estudio de antioxidantes de origen natural en la prevención y tratamiento tanto de la hipertensión como de sus consecuencias a nivel cardiovascular, en los que se han obtenido resultados prometedores.

El suplemento de la dieta con 75 y 200 mg/kg/día de astaxantina durante 8 semanas mostró en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) disminución de la presión arterial, mejora de la función endotelial y efectos beneficiosos sobre el remodelado cardiovascular. La hipertrofia cardíaca asociada a la hipertensión disminuyó de manera estadísticamente significativa con la administración de astaxantina, si bien la reducción fue mayor con la dosis de 75 mg/kg que con la de 200 mg/kg. La astaxantina también mejoró la funcionalidad vascular en arterias de resistencia (renales) pero no en arterias de conductancia (aorta). Además, disminuyó el estrés oxidativo y la fibrosis<sup>180</sup>.

El licopeno también fue eficaz en el tratamiento de la hipertensión en ratas SHR. La administración de licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día disminuyó la presión arterial desde la primera semana de tratamiento. La administración de licopeno, que se prolongó durante 4 semanas, redujo tanto la hipertrofia cardíaca como renal. La disminución significativa de los niveles plasmáticos de malondialdehído y de la producción estimulada de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  indicaron que el licopeno disminuye el estrés oxidativo asociado a la hipertensión<sup>181</sup>.

Por otra parte, también se han llevado a cabo estudios con astaxantina y licopeno en un modelo de hipertensión inducido por angiotensina II (Ang II). El tratamiento con astaxantina o licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día previno el incremento de PAS en ratas que recibieron una infusión de Ang II, aunque el licopeno resultó más eficaz. Ambos carotenoides previnieron los procesos de remodelado cardíaco asociados a la hipertensión, pues disminuyeron la hipertrofia cardíaca. Se llevaron a cabo estudios de reactividad vascular en las ratas tratadas con licopeno pero no se observaron beneficios en ningún lecho vascular, la pérdida de respuesta relajante dependiente de endotelio observada en los animales que recibieron infusión de Ang II se mantuvo. El licopeno sí demostró efectos beneficiosos sobre marcadores de estrés oxidativo, pues previno la peroxidación lipídica y la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ , así como el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y GPx)<sup>182</sup>.

## Antecedentes y objetivos

En los últimos años, nuestro objetivo ha sido ampliar el estudio de los efectos de estos carotenoides en el contexto del SM. Con los antecedentes antes descritos, y teniendo en cuenta la potencia antioxidante que la bibliografía atribuye a la astaxantina y al licopeno, nos planteamos estudiar su actividad en un modelo de SM inducido por una dieta rica en fructosa y en grasa.

Los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Estudiar el efecto de una dieta suplementada con astaxantina o licopeno en la prevención y tratamiento del síndrome metabólico inducido con una alimentación rica en fructosa o en fructosa y en grasa.
2. Investigar el efecto de la astaxantina y del licopeno sobre las alteraciones funcionales y estructurales provocadas por el síndrome metabólico en los órganos diana.
3. Evaluar la capacidad antioxidante de la astaxantina y del licopeno en modelos *in vitro* de disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo.

**SÍNDROME METABOLICO EN ANIMALES -  
METODOLOGÍA**





## 1. Diseño experimental

Los experimentos se realizan teniendo en cuenta las disposiciones legales existentes en materia de experimentación animal: Directiva 2010/63/UE, de 22 de septiembre y Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.

Para el estudio se emplean ratas Wistar o ratones C57BL/6J macho procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Los animales se adquirieron con 8 semanas de vida y se mantuvieron en el estabulario del SEA, a una temperatura constante de 22 °C, con una humedad ambiental del 60% y un tiempo de luz regulado con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se distribuyen en un máximo de tres o cinco animales por jaula, según se trate de ratas o ratones respectivamente, con acceso libre a comida y bebida.

Para investigar el efecto de una dieta suplementada en astaxantina o licopeno en la prevención o tratamiento del SM se han diseñado tres estudios experimentales.

### 1.1 Síndrome metabólico en ratas

El SM se induce en ratas Wistar con una alimentación rica en fructosa, que se incorpora al agua de bebida en una concentración del 20%. La disolución de fructosa (Alimentación y Farmacia S.A., Alifarma, España) se prepara cada dos días para evitar el crecimiento microbiano. Los animales tienen acceso libre a la bebida y al pienso estándar comercial empleado en el SEA (PicoLab® Select Rodent 50 IF/6F, Lab Supply, EEUU).

La astaxantina (Lucantin® Pink, BASF, EEUU) o el licopeno (Redivivo®, DSM NUTRITIONAL PRODUCTS, México) se incorporan al pienso para conseguir una dosis de 10 mg/kg/día. La desecación de los pellets de pienso preparados se realiza a temperatura ambiente y al abrigo de la luz para evitar la degradación de los componentes termolábiles y/o fotosensibles, como los carotenoides. El pienso seco se mantiene refrigerado (4-8 °C) un máximo de 15 días. La concentración de astaxantina y licopeno se ajusta en función del peso corporal y el consumo de pienso.

Los animales se distribuyen en los siguientes grupos experimentales:

- **C.** Control (n = 5).
- **F.** Fructosa en el agua de bebida (n = 7).

- **F + AXT.** Fructosa en el agua de bebida y dieta suplementada con astaxantina para conseguir una dosis de 10 mg/kg/día (n = 5).
- **F + LIC.** Fructosa en el agua de bebida y dieta suplementada con licopeno para conseguir una dosis de 10 mg/kg/día (n = 7).

El tratamiento con la dieta rica en fructosa se prolonga hasta las 8 semanas, como se muestra en el siguiente esquema:



## 1.2 Síndrome metabólico en ratones

El modelo experimental empleado consiste en inducir el SM con una alimentación rica en fructosa y en grasa que reproduce más fielmente la dieta que origina el SM en humanos.

Las dietas para la alimentación de los animales se diseñan y elaboran en nuestro laboratorio. La desecación y la conservación de los pellets obtenidos se realiza en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior.

La dieta estándar se diseña de acuerdo a las recomendaciones para estudios de nutrición del Instituto Americano de Nutrición<sup>183</sup>. En la dieta rica en fructosa y en grasa (FG), se añade manteca de cerdo y fructosa, por lo que se incrementa el contenido en lípidos y en azúcares sencillos, en detrimento de los carbohidratos complejos. En la tabla 3 se describe la composición de ambas dietas; la composición de la mezcla comercial de minerales y vitaminas se detalla en la tabla 4. En la tabla 5 se indica el contenido calórico de cada una de las dietas empleadas y la contribución de cada nutriente al contenido calórico final.

La astaxantina o el licopeno se incorporan al pienso en un porcentaje determinado: 0,1 y 0,01% para la astaxantina y 0,01% para el licopeno.

Caseína, DL-metionina, colato de sodio,  $\alpha$ -celulosa y carboximetilcelulosa sódica fueron suministrados por Sigma-Aldrich (España), el almidón de patata por Panreac (España), la sacarosa por la Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR (España), la fructosa por Alimentación y Farmacia S.A. -Alifarma- (España), el aceite de maíz por Deoleo S.A. (España), la manteca de cerdo por embutidos MONTER S.L.U. (España), los minerales y las vitaminas por MP Biomedicals (España).

**Tabla 2.** Composición en % de las dietas elaboradas en el laboratorio en el modelo de síndrome metabólico.

Nutrientes	Componentes	DE-L	FG-L
Proteínas	Caseína	24,00	24,00
	D/L Metionina	0,10	0,10
Hidratos de Carbono	Almidón	54,35	14,00
	Sacarosa	10,00	10,00
	Fructosa	0,00	24,20
Lípidos	Aceite de maíz	5,30	3,00
	Manteca de cerdo	0,00	18,45
Oligoelementos	Minerales	1,40	1,40
	Vitaminas	1,10	1,10
	Colato de sodio	0,25	0,25
Fibra	Celulosa	3,50	2,70
	Carboximetilcelulosa sódica	0,00	0,80

DE-L: dieta estándar elaborada en el laboratorio; FG-L: dieta rica en fructosa y en grasa elaborada en el laboratorio.

**Tabla 4.** Composición detallada de la mezcla comercial de vitaminas (AIN-93 Vitamin Mix) y minerales (AIN-93M Mineral Mix).

MEZCLA MINERALES	% en la mezcla	MEZCLA VITAMINAS	% en la mezcla
Carbonato cálcico	35,70	Ácido nicotínico	0,300
Fosfato monopotásico	25,00	Pantotenato de D-calcio	0,160
Cloruro sódico	7,40	Piridoxina	0,070
Sulfato potásico	4,66	Tiamina	0,060
Citrato potásico monohidratado	2,80	Riboflavina	0,060
Óxido de magnesio	2,40	Ácido fólico	0,020
Citrato férrico	6,06	D-biotina	0,002
Carbonato de zinc	1,65	Vitamina B12	0,250
Carbonato magnésico	6,30	α-tocoferol	3,000
Carbonato de cobre	3,00	Palmitato de vitamina A	0,160
Yodato potásico	0,10	Vitamina D3	0,025
Seleniato sódico	0,10	Fitoquinona	0,008
Molibdato amónico	0,08	Azúcar	95,966
Metasilicato sódico	14,50		
Sulfato de potasio y sodio	2,75		
Ácido bórico	0,82		
Fluoruro sódico	0,63		
Carbonato de níquel	0,32		
Cloruro de litio	0,17		
Vanadato amónico	0,07		
Azúcar	20,98		

**Tabla 5.** Contenido calórico de las dietas utilizadas en el modelo de síndrome metabólico.

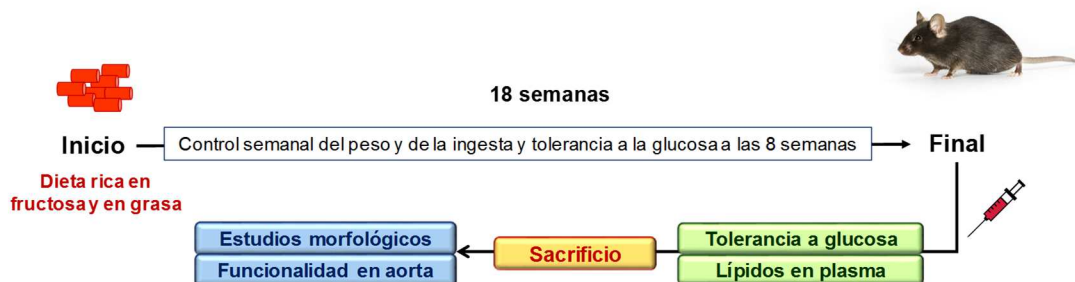
	DE-C	DE-L	FG-L
<b>Proteínas (Kcal%)</b>	22,0	23,7	19,8
<b>Grasa (Kcal%)</b>	14,7	11,7	39,5
<b>Hidratos de carbono (Kcal%)</b>	63,3	64,6	40,7
<b>Calorías (Kcal/g)</b>	3,6	4,1	4,9

DE-C: dieta estándar comercial; DE-L: dieta estándar elaborada en el laboratorio; FG-L: dieta rica en fructosa y en grasa elaborada en el laboratorio.

Los animales se distribuyen en los siguientes grupos experimentales, en función de la alimentación que reciben:

- **DE-L.** Dieta estándar elaborada en el laboratorio (n=13).
- **FG-L.** Dieta rica en fructosa y en grasa (n=8).
- **FG + AXT 0,1.** Dieta rica en fructosa y en grasa suplementada con 0,1% de astaxantina (n=7).
- **FG + AXT 0,01.** Dieta rica en fructosa y en grasa suplementada con 0,01% de astaxantina (n=4).
- **FG + LIC 0,01.** Dieta rica en fructosa y en grasa suplementada con 0,01% de licopeno (n=5).
- **DE-C.** Dieta estándar comercial empleada en el SEA de la Universidad de Salamanca (n = 5)

El tratamiento con la dieta rica en fructosa y en grasa se prolonga hasta las 18 semanas, como se muestra en el siguiente esquema:



### 1.3 Tratamiento del síndrome metabólico en ratones

En este caso se utiliza como base el pienso comercial enriquecido con fructosa y grasa, suplementado con los carotenoides cuando sea necesario. En la preparación de esta dieta, se añade manteca de cerdo y fructosa en la misma proporción que la utilizada en el estudio anterior. La diferencia reside en que el resto de componentes corresponde al pienso comercial PicoLab® Select Rodent 50IF/6F. Las condiciones de desecación y conservación de los pellets son iguales a las descritas previamente para el pienso elaborado íntegramente por nosotros. El contenido calórico (FG-L, 4,9 Kcal/g Kcal/g y FG-C, 4,7 Kcal/g) y la contribución de las grasas (FG-L, 39,5% y FG-C, 41,9%) al contenido calórico final son similares en ambas dietas enriquecidas en fructosa y en grasa mientras que la contribución de los hidratos de carbono es ligeramente superior en el pienso elaborado a partir de la dieta comercial (FG-L, 40,7% y FG-C, 48,5%).

Tras 8 semanas de tratamiento con la dieta enriquecida en fructosa y en grasa se comprueba si el SM está presente, teniendo en cuenta los cambios producidos en el peso corporal y el test de tolerancia a la glucosa, se inicia el tratamiento con astaxantina y licopeno durante 10 semanas. La astaxantina o el licopeno se incorporan al pienso en un porcentaje del 0,01%. Con este ensayo se evalúa la capacidad de la astaxantina y del licopeno para revertir o mejorar algunos de los parámetros metabólicos y bioquímicos cuando el SM está ya instaurado. El esquema seguido en este ensayo y la distribución de los animales se muestran a continuación:



- **DE-C.** Dieta estándar comercial empleada en el SEA de la Universidad de Salamanca (n=16).
- **FG-C.** Dieta elaborada a partir de la dieta comercial enriquecida en fructosa y grasa (n=9).
- **FG-C + AXT 0,01.** Dieta elaborada a partir de la dieta comercial enriquecida en fructosa y grasa suplementada con 0,01% de astaxantina (n=11).
- **FG-C + LIC 0,01.** Dieta elaborada a partir de la dieta comercial enriquecida en fructosa y grasa suplementada con 0,01% de licopeno (n=7).

En los tres estudios realizados, se controla el consumo de agua y pienso semanalmente, datos que sirven para calcular la ingesta calórica y la dosis de carotenoide que reciben.

Una vez finalizado el tratamiento, los animales se anestesian con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se extraen muestras de sangre a partir del seno venoso orbitario en ratas o de la vena cava inferior en ratones. A continuación, los animales se sacrifican y se extraen el corazón, el riñón derecho, el hígado y la grasa abdominal. En ratones también se extrae la arteria aorta para la realización de estudios de funcionalidad. Los órganos se mantienen en solución Krebs (anexo 1) a 4°C durante su procesamiento.

## 2. Peso corporal y obesidad abdominal

El peso de los animales se controla semanalmente para evaluar los efectos del tratamiento sobre este parámetro. El peso en el momento del sacrificio o la longitud de la tibia se utiliza para el cálculo de diversos índices de hipertrofia.

El exceso de grasa abdominal se considera un FRCV y constituye uno de los criterios para el diagnóstico de SM. Se extrae la grasa epididimal y la grasa retroperitoneal, se colocan en Krebs frío y se eliminan los restos de tejido no graso. Sobre un papel de filtro se elimina el exceso de líquido y se pesa.

*Los valores de grasa abdominal se expresan en mg. El índice de obesidad abdominal se obtiene como la relación entre la grasa abdominal y el peso corporal o la longitud de la tibia.*

### 3. Presión arterial

La PAS se mide en la arteria caudal mediante un método incruento, que tiene la ventaja de ser simple, reproducible, no traumático y permite trabajar con el animal despierto. Para habituar al animal a este tipo de manipulación, se mide la presión arterial al menos tres veces antes de iniciar cualquier protocolo. Las medidas se realizan a la misma hora y en el mismo lugar, con una temperatura, ruido y limpieza adecuados para el bienestar de los animales. Se utiliza un equipo *CODA non-invasive blood pressure system* (Kent Scientific Corporation, EEUU) que, mediante un software y un equipo informático adecuado, permite la obtención de valores de presión. Los animales se colocan en un cepo de manera que la cola queda libre para poder colocar el manguito y el transductor que mide el volumen de sangre en la arteria caudal. El equipo dispone de una plataforma térmica que permite la dilatación de la arteria caudal para captar mejor la señal.

Se determina el valor de PAS antes de comenzar los diferentes estudios, durante y al finalizar los tratamientos.

*Los resultados de PAS se expresan en mmHg.*

### 4. Hipertrofia cardíaca y renal

Con el fin de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre corazón y riñones, órganos que suelen desarrollar hipertrofia en respuesta a un incremento de la presión arterial, ambos se extraen para evaluar el grado de hipertrofia cardíaca o de hipertrofia renal. El corazón se coloca inmediatamente en Krebs a 37 °C, aireado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, Air Liquide, S.A., España) para mantener el latido y eliminar los restos de sangre y, posteriormente, se coloca en Krebs frío. Se eliminan cuidadosamente los restos de tejido graso y se separan las aurículas y, en el caso de los estudios en ratas, también el ventrículo derecho. Sobre un papel de filtro se elimina el exceso de líquido y se pesa. Con el riñón derecho se procede de igual forma después de separar la grasa que lo rodea.

*La relación entre el peso de estos órganos y el peso corporal o la longitud de la tibia se utiliza como índice de hipertrofia cardíaca (HC) o índice de hipertrofia renal (HR).*



## 5. Tolerancia a la glucosa

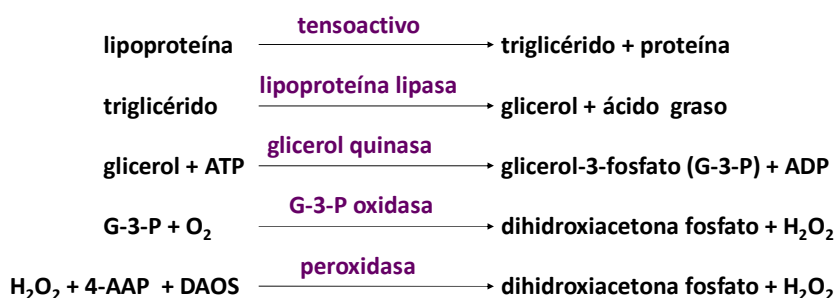
Después de 14 horas de ayuno se determina la glucemia basal. Para ello, se emplea un glucómetro digital y tiras reactivas Accu-Check Performa (Roche, España). La sangre se obtiene mediante un corte en la cola del animal, se desecha la primera gota y la siguiente se deposita sobre la tira reactiva. Posteriormente se administra por vía oral en ratas o por vía intraperitoneal en ratones, una dosis de glucosa de 2 g/kg y se mide la glucemia a los 30, 60 y 120 minutos de la administración. La prueba de tolerancia a la glucosa se realiza a las 8 semanas en ratones y al finalizar el tratamiento en todos los ensayos.

*Los valores de glucemia se expresan en mg/dL. Se construye la curva de glucemia en función del tiempo y se calcula el área bajo la curva (ABC), como una medida de la exposición del organismo a la glucosa, expresando los resultados en mg x min/dL.*

## 6. Determinación del perfil lipídico en plasma

Los niveles de lípidos plasmáticos se determinan al finalizar el tratamiento. La sangre se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos y el plasma obtenido se congela a -80 °C hasta su posterior análisis. Todas las determinaciones se llevan a cabo con un Analizador SPOTCHEM, empleando las tiras reactivas de SPOTCHEM (Menarini Diagnostic S.A., España), diseñadas para el diagnóstico *in vitro*.

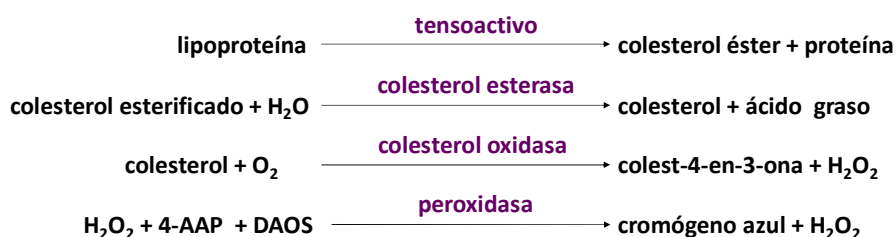
Para la determinación de **TG**, **CT** o **HDLc**, el primer paso es utilizar un tensoactivo para separarlo de las proteínas correspondientes. Los TG presentes en las muestras se hidrolizan enzimáticamente mediante una lipasa formando glicerol y ácidos grasos. El glicerol formado, a través de varias reacciones acopladas, da lugar a un cromógeno azul que se mide por espectrofotometría de reflexión a 610 nm. Las reacciones implicadas son las siguientes:



## Metodología

4-AAP: 4-aminoantipirina, DAOS: sal sódica de N-Etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina.

El colesterol esterificado se transforma en colesterol libre por acción de la colesterol esterasa. A continuación, el colesterol se oxida por la colesterol oxidasa formando colesteno y  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  da un cromógeno azul, que se mide por espectrofotometría de reflexión a 610 nm. La cuantificación del HDLc se realiza con tiras reactivas SPOTCHEM, diseñadas para la determinación específica del HDLc, que al igual que en la valoración de los TG y CT, se basa en la formación de un cromógeno azul. Las reacciones que tienen lugar son:



Los valores de LDLc se obtienen por un método indirecto mediante la relación existente entre el LDLc con el CT, el HDLc y los TG según la fórmula de Friedewald.

$$\text{LDLc} = \text{CT} - \text{HDLc} - \frac{\text{TG}}{5}$$

*La concentración de los lípidos se expresa en mg/dL.*

El índice aterogénico (IA) también se conoce como índice de riesgo cardiovascular, pues orienta sobre la formación de las placas de ateroma en los vasos sanguíneos y, con ello, de la posibilidad de padecer eventos cardiovasculares, como infarto o ictus. Existen varias formas de calcular este índice; en este caso, hemos empleado la relación entre la concentración de CT y la de HDLc.

$$\text{IA} = \frac{\text{CT}}{\text{HDLc}}$$

## 7. Análisis histológico del hígado

El hígado también se extrae en el momento del sacrificio del animal, se eliminan los restos de tejido no hepático y el exceso de líquido y se pesa. De esta manera, teniendo en cuenta el peso o la longitud de la tibia del animal se calcula el índice de hipertrofia hepática.

Para realizar los estudios histológicos, uno de los lóbulos hepáticos se fija en formol tamponado al 4% y, posteriormente, se incluye en parafina sintética utilizando un procesador automático de tejidos (Shandon-Elliot modelo Bench SCE 0400, Reino Unido) con un programa de cambio de alcoholes. Se realizan cortes seriados de estas muestras de 4-5  $\mu\text{m}$  de grosor que se tiñen con hematoxilina-eosina, con el fin de aumentar el contraste y facilitar las medidas.

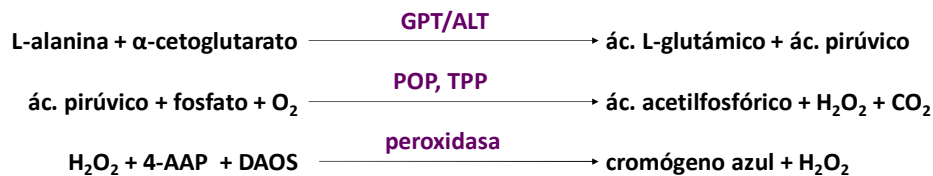
Los cortes teñidos se observan al microscopio óptico (Olympus BX50, Alemania); se emplean los aumentos de 200x y 400x. Las muestras se escanean con un microscopio DOT SLIDE (Olympus, Alemania), facilitando el manejo y el procesamiento de las imágenes. Se mide el grado de esteatosis hepática mediante el cálculo del área relativa correspondiente a las gotículas de grasa presentes en la preparación. Se toman 10 imágenes, se calcula la superficie grasa relativa y se obtiene la media.

$$\text{Grado de esteatosis} = \frac{\sum \text{área relativa correspondiente a vesículas de grasa de tamaño intermedio y grande}}{\text{n}^{\circ} \text{ de imágenes}}$$

## 8. Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático

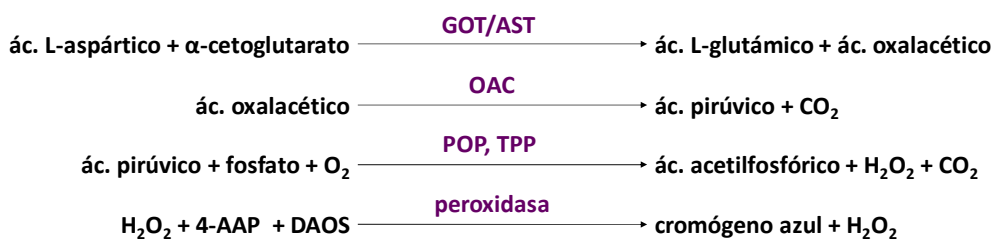
La elevación de transaminasas y fosfatasa alcalina en plasma se consideran indicadores fiables de la aparición de daño hepático. El daño en los hepatocitos produce alteraciones en el transporte y en la permeabilidad de la membrana produciendo un incremento de la actividad en plasma de enzimas hepáticas, como la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST). Para la determinación de estas enzimas se utilizan muestras de plasma obtenido por centrifugación de la sangre como se indicó anteriormente y tiras reactivas.

La ALT cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato, formando piruvato y glutamato. La actividad de la enzima se determina a partir de la formación de un cromógeno azul que se mide por espectrofotometría de reflexión a 610 nm.



OAC: ácido oxalacético descarboxilasa; POP: piruvato oxidasa; TPP: ácido de pirofosfato de tiamina.

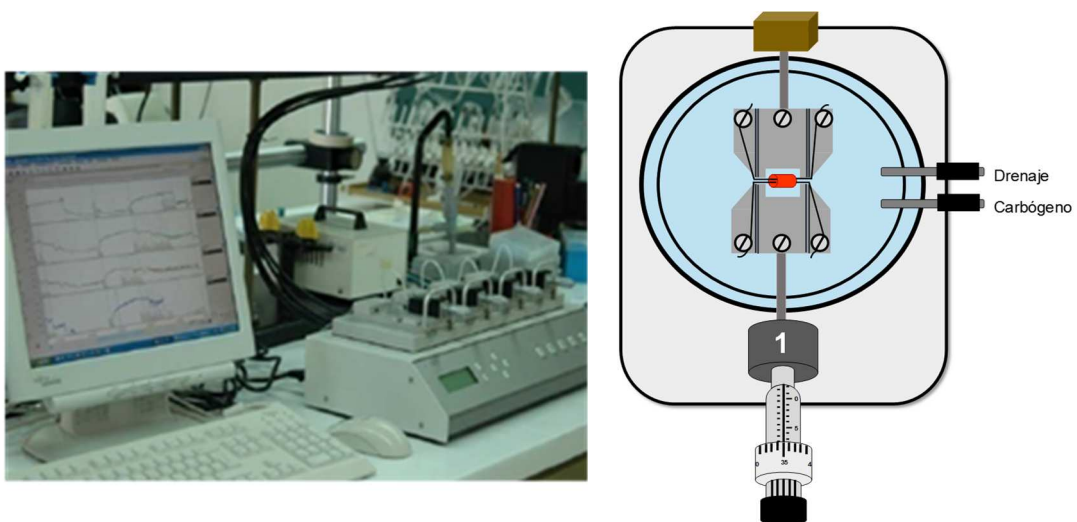
La AST cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La actividad de la enzima se determina a partir de la formación de un cromógeno azul que se mide por espectrofotometría de reflexión a 610 nm.



*La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales por litro (UI/L).*

## 9. Estudios de funcionalidad en arteria aorta de ratón

Para los estudios de funcionalidad en aorta se utiliza un miógrafo de cuatro canales (Multiwire Myograph System, DMT Modelo 610M, Dinamarca). Previamente al montaje de los anillos y después de extraer la arteria aorta se procede a la eliminación del tejido conectivo y graso que la rodea. A continuación, se corta en anillos de aproximadamente 2 mm de longitud. A través de la luz de cada segmento se introducen dos alambres de acero inoxidable de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, uno se coloca en la parte fija que corresponde al transductor, mientras que el otro se une a la parte móvil que está unida a un tornillo micrométrico. Una vez que los anillos están montados en los baños con solución Krebs a 37 °C y con suministro suficiente de carbógeno se espera 20 minutos para que la preparación se estabilice. Posteriormente, se normalizan los anillos a una tensión equivalente a 90 mmHg y tomando este punto de partida, se someten a una tensión adicional de 5 mN. En la figura 15 se muestra el equipo empleado.



**Figura 15.** Miógrafo y detalle del baño de órganos para el montaje de anillos de aorta de ratón para los estudios de funcionalidad.

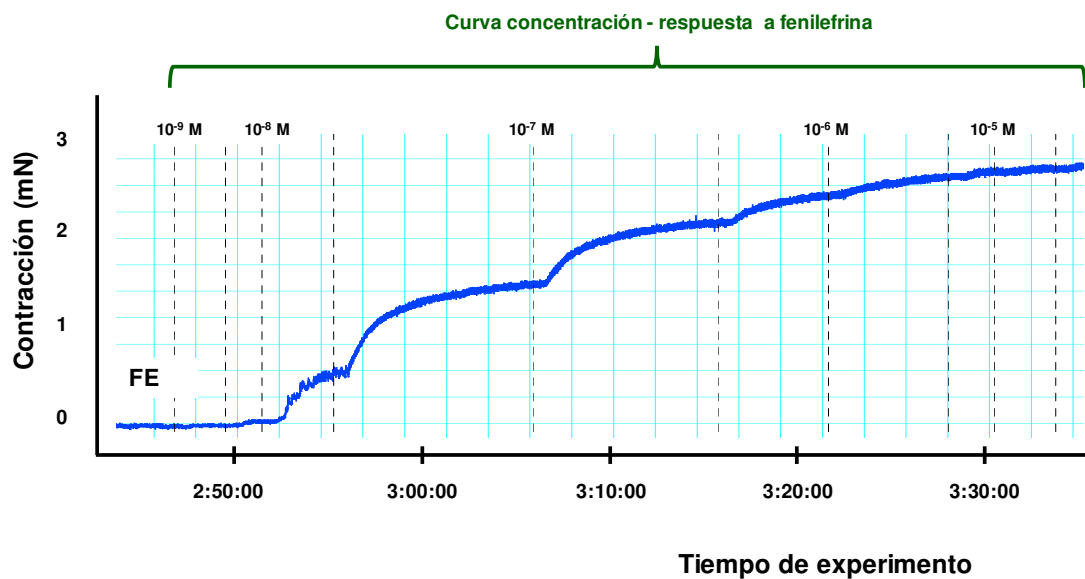
Cada anillo se deja estabilizar durante 30 minutos reajustando la tensión a los 15 minutos. La funcionalidad del tejido se comprueba añadiendo al baño una solución hiperpotásica (KPSS, anexo 1), que se mantiene durante 10 minutos, tiempo

suficiente para alcanzar meseta estable de contracción. Esta operación se repite dos veces y se obtiene la media de las dos respuestas contracturantes. Posteriormente, se lavan repetidamente los anillos, se dejan estabilizar durante 15 minutos, tiempo aproximado que tarda el anillo en recuperar la tensión basal. A partir de este momento, se procede a la realización de los siguientes protocolos:

- **Curvas concentración-respuesta a agentes contracturantes**

Se añaden al baño, de forma acumulativa, concentraciones crecientes de fenilefrina (FE,  $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) o serotonina (5-HT,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M). Antes de añadir la siguiente concentración, se espera el tiempo suficiente para obtener una meseta estable de contracción (figura 16).

*Los resultados se expresan como % de contracción frente a la respuesta obtenida con KPSS.*

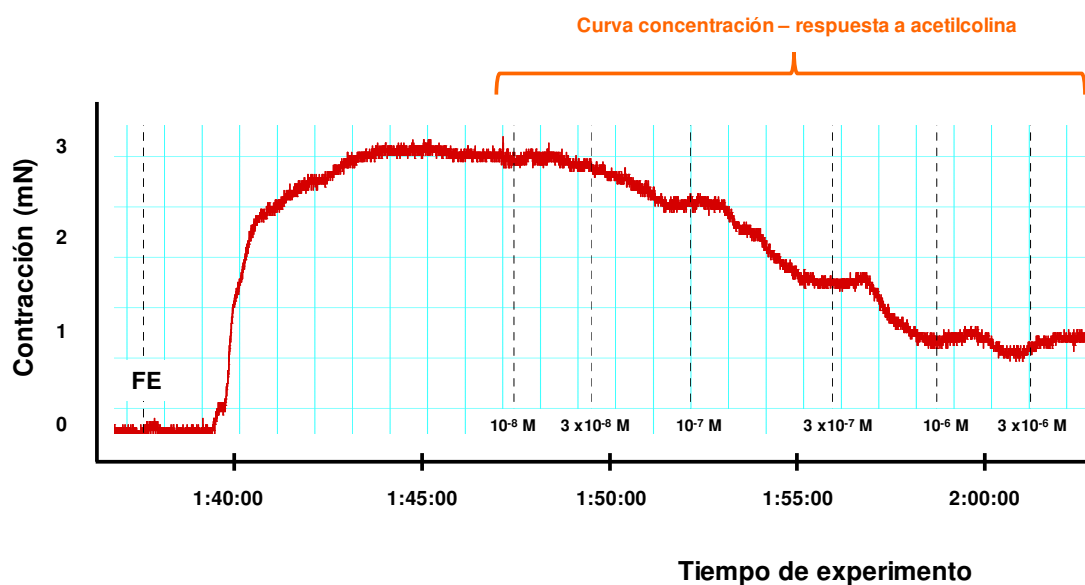


**Figura 16.** Registro original de una curva de contracción a fenilefrina en anillos de arteria aorta de ratón.

▪ **Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes**

Los anillos se precontraen con FE,  $10^{-5}$  M. Cuando se alcanza una meseta de contracción estable, se realizan curvas acumulativas concentración-respuesta de los siguientes agentes relajantes: acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-6}$  M) (figura 17), cuya acción relajante es endotelio dependiente y nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), para valorar la relajación independiente de endotelio.

*Los resultados se expresan como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE.*



**Figura 17.** Registro original de una curva de relajación a acetilcolina en anillos de arteria aorta de ratón.

En los anexos se detallan las sustancias y disoluciones empleadas en los diferentes experimentos.

## **10. Expresión y análisis estadístico de los resultados**

Todos los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) de un mínimo de 4 experimentos. Para comparar los valores obtenidos entre los diferentes grupos se utiliza la *t* de student o el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido del test de Bonferroni, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

Para ajustar las curvas concentración-respuesta, se utiliza el ajuste a un modelo logístico no lineal utilizando el programa GraphPad Prism versión 5 (GraphPad software Inc. EEUU). En todas las curvas se obtuvo el valor del efecto máximo ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$  (logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que provoca el 50% del  $E_{max}$ ). Para comparar las curvas y sus parámetros se utiliza una prueba F de Snedecor.



**SÍNDROME METABÓLICO EN ANIMALES –  
RESULTADOS**

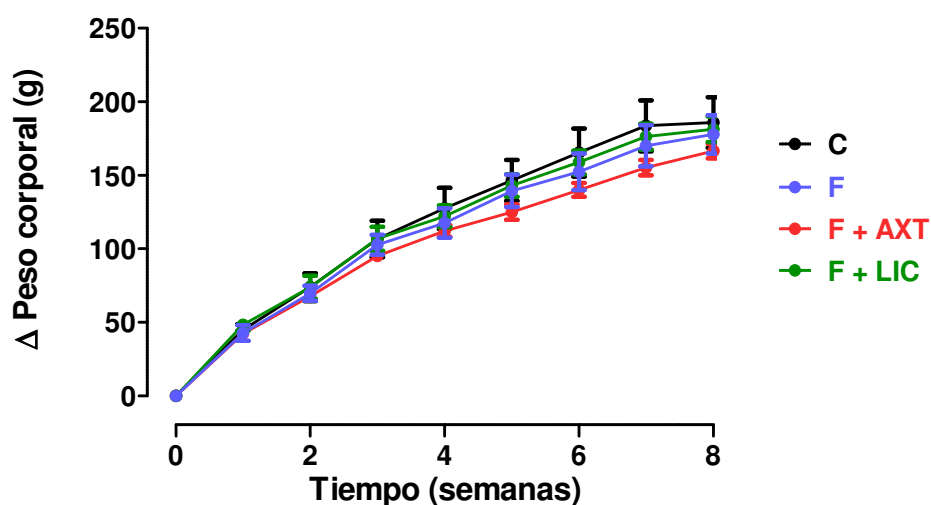


## SÍNDROME METABÓLICO EN RATAS

### 1. Peso corporal e índice de grasa abdominal

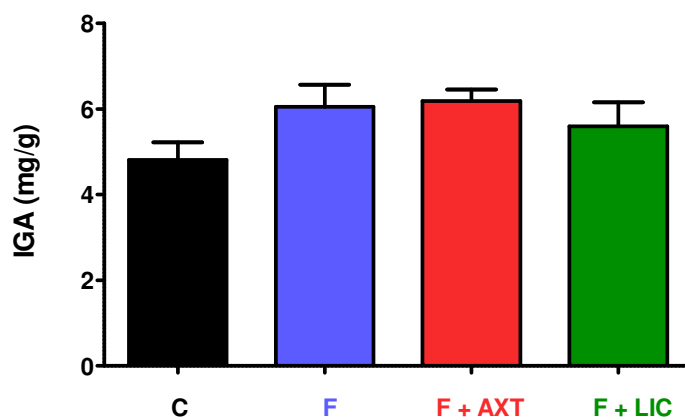
Al inicio del estudio el peso de los animales fue de  $241 \pm 3$  g. En la figura 18 se puede observar que la evolución del peso corporal fue similar en todos los grupos estudiados. La ingesta de fructosa no produjo cambios en este parámetro. Además, se determinó el peso de la grasa abdominal y se calculó el índice de grasa abdominal (IGA) que permite normalizar el peso de la grasa abdominal con el peso corporal. La grasa abdominal se incrementó, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, en los grupos tratados con fructosa, especialmente en el grupo que recibió solo fructosa (figura 19).

Los animales que recibieron fructosa consumieron menos cantidad de pienso, sin embargo, la ingesta calórica fue similar en todos los grupos (tabla 6).



**Figura 18.** Incremento de peso corporal a lo largo del ensayo. Control (C), fructosa (F), fructosa más astaxantina 10 mg/kg/día (F + AXT) y fructosa más licopeno 10 mg/kg/día (F + LIC).

## Resultados



**Figura 19.** Índice de grasa abdominal (IGA), calculado como la relación entre el peso de la grasa abdominal (epididimal + retroperitoneal) y el peso corporal. Control (C), fructosa (F), fructosa más astaxantina 10 mg/kg/día (F + AXT) y fructosa más licopeno 10 mg/kg/día (F + LIC).

**Tabla 6.** Consumo de fructosa y de pienso e ingesta calórica.

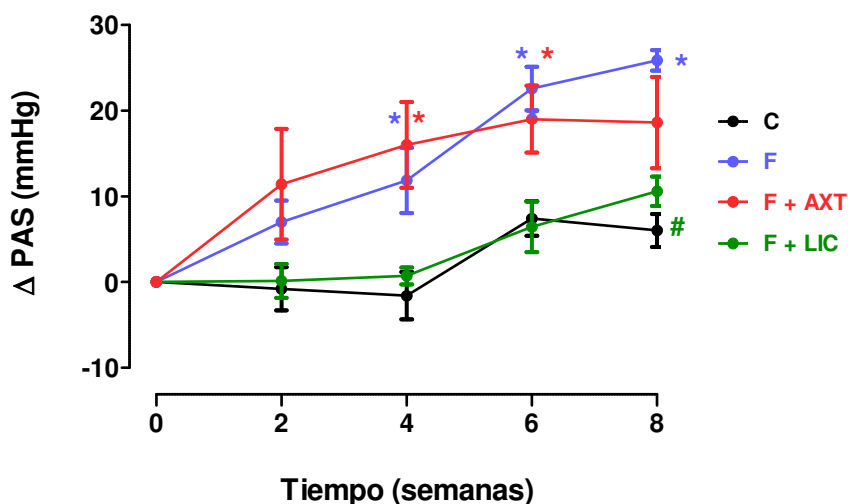
	Ingesta		
	Fructosa (g)	Pienso (g)	Kcal/día
<b>C</b>	-	25 ± 2	91 ± 1
<b>F</b>	8 ± 1	16 ± 1*	90 ± 2
<b>FG + AXT</b>	9 ± 1	16 ± 0*	93 ± 2
<b>F + LIC</b>	8 ± 2	17 ± 2*	94 ± 1

Control (C), fructosa (F), fructosa más astaxantina 10 mg/kg/día (F + AXT) y fructosa más licopeno 10 mg/kg/día (F + LIC). \* $p < 0,05$  vs C.

## 2. Presión arterial e hipertrofia cardíaca y renal

Uno de los parámetros que pueden estar alterados en el SM es la presión arterial. Las medidas se realizaron cada dos semanas observando que la dieta con fructosa causó un incremento significativo de la PAS a las 4 semanas y al finalizar el tratamiento alcanzó los 25 mmHg. El licopeno evitó este aumento de la presión. En los animales tratados con astaxantina observamos a partir de la cuarta semana una menor progresión en el incremento de la PAS y a las 8 semanas el valor fue de  $113 \pm 4$  mmHg frente a  $134 \pm 2$  mmHg del grupo que recibió solo fructosa, pero al existir una mayor dispersión en los datos las diferencias no alcanzaron significación estadística (figura 20 y tabla 7).

En la hipertensión la sobrecarga de presión conduce al desarrollo de hipertrofia cardíaca. Asimismo, el riñón es uno de los órganos que más daño sufre cuando las cifras de presión arterial se mantienen permanentemente elevadas. La dieta rica en fructosa aumentó los índices de hipertrofia cardíaca y renal, aunque solo fue significativa en el primer caso. Ambos carotenoides previnieron el desarrollo de hipertrofia cardíaca y renal de forma similar. Estos resultados apoyarían la capacidad real del tratamiento con astaxantina para reducir la PAS.



**Figura 20.** Incremento de la presión arterial sistólica (PAS). Control (C), fructosa (F), fructosa más astaxantina 10 mg/kg/día (F + AXT) y fructosa más licopeno 10 mg/kg/día (F + LIC).

\* $p < 0,05$  vs C; # $p < 0,05$  vs F.

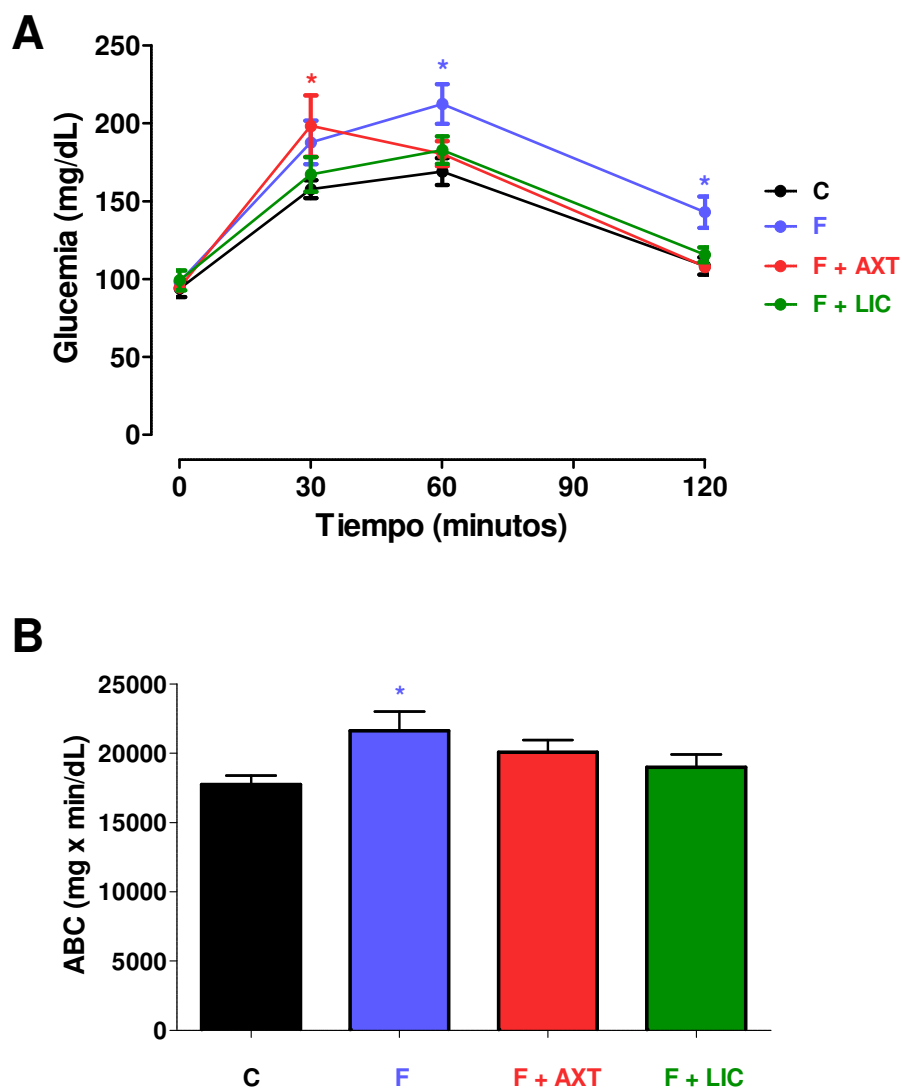
**Tabla 7.** Incremento de presión arterial sistólica ( $\Delta$ PAS) e índices de hipertrofia cardíaca (HC) y renal (HR).

	$\Delta$ PAS	HC	HR
	mmHg	mg/g	mg/g
<b>C</b>	6 $\pm$ 2*#	1,58 $\pm$ 0,04#	2,79 $\pm$ 0,09
<b>F</b>	26 $\pm$ 1*	1,80 $\pm$ 0,01*	3,02 $\pm$ 0,06
<b>F + AXT</b>	19 $\pm$ 5*	1,66 $\pm$ 0,06#	2,76 $\pm$ 0,06
<b>F + LIC</b>	11 $\pm$ 2#	1,66 $\pm$ 0,01#	2,74 $\pm$ 0,05

Control (C), fructosa (F), fructosa más astaxantina 10 mg/kg/día (F + AXT) y fructosa más licopeno 10 mg/kg/día (F + LIC). \* $p < 0,05$  vs C; # $p < 0,05$  vs F.

### 3. Tolerancia a la glucosa

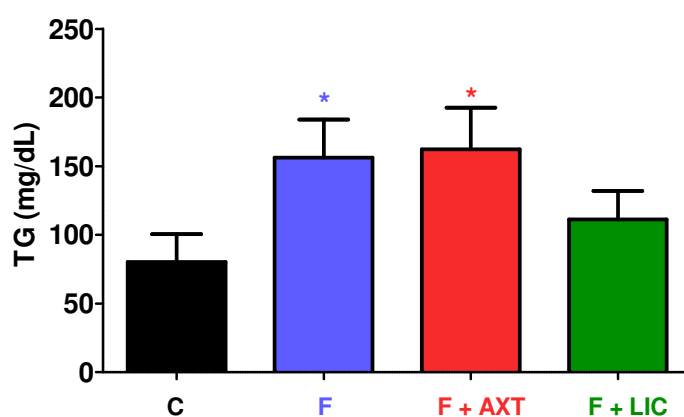
Para evaluar el efecto de los carotenoides sobre la sensibilidad a la insulina, al finalizar el tratamiento, se midió la glucemia basal en ayunas y se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa. No hubo diferencias en la glucemia en ayunas pero el grupo alimentado con una dieta rica en fructosa presentó una reducción significativa de la tolerancia a la glucosa administrada por vía oral (figura 21-A) que también se pone de manifiesto al obtener los valores de ABC (figura 21-B). El tratamiento con astaxantina y, especialmente, con licopeno mejoró ligeramente la intolerancia a la glucosa que produce la ingesta de fructosa. En el grupo tratado con astaxantina se obtuvo un pico de glucemia a los 30 minutos de la administración de la glucosa, pero recuperó los valores del grupo control en la medida de los 60 minutos.



**Figura 21.** Prueba de tolerancia a la glucosa **[A]** y área bajo la curva (ABC) **[B]** a las 8 semanas de estudio. Control (C), fructosa (F), fructosa más astaxantina 10 mg/kg/día (F + AXT) y fructosa más licopeno 10 mg/kg/día (F + LIC). \* $p < 0.05$  vs C.

#### 4. Determinación del perfil lipídico en plasma

Los datos de CT no se pudieron determinar, pues eran inferiores al límite de detección del aparato empleado. Los animales que recibieron fructosa presentaron unos niveles de TG superiores a los obtenidos en el grupo control. El tratamiento con licopeno redujo dichos niveles, disminución que no se observó en el grupo tratado con astaxantina (figura 22).



**Figura 22.** Concentración plasmática de triglicéridos (TG). Control (C), fructosa (F), fructosa más astaxantina 10 mg/kg/día (F + AXT) y fructosa más licopeno 10 mg/kg/día (F + LIC). \* $p < 0.05$  vs C.

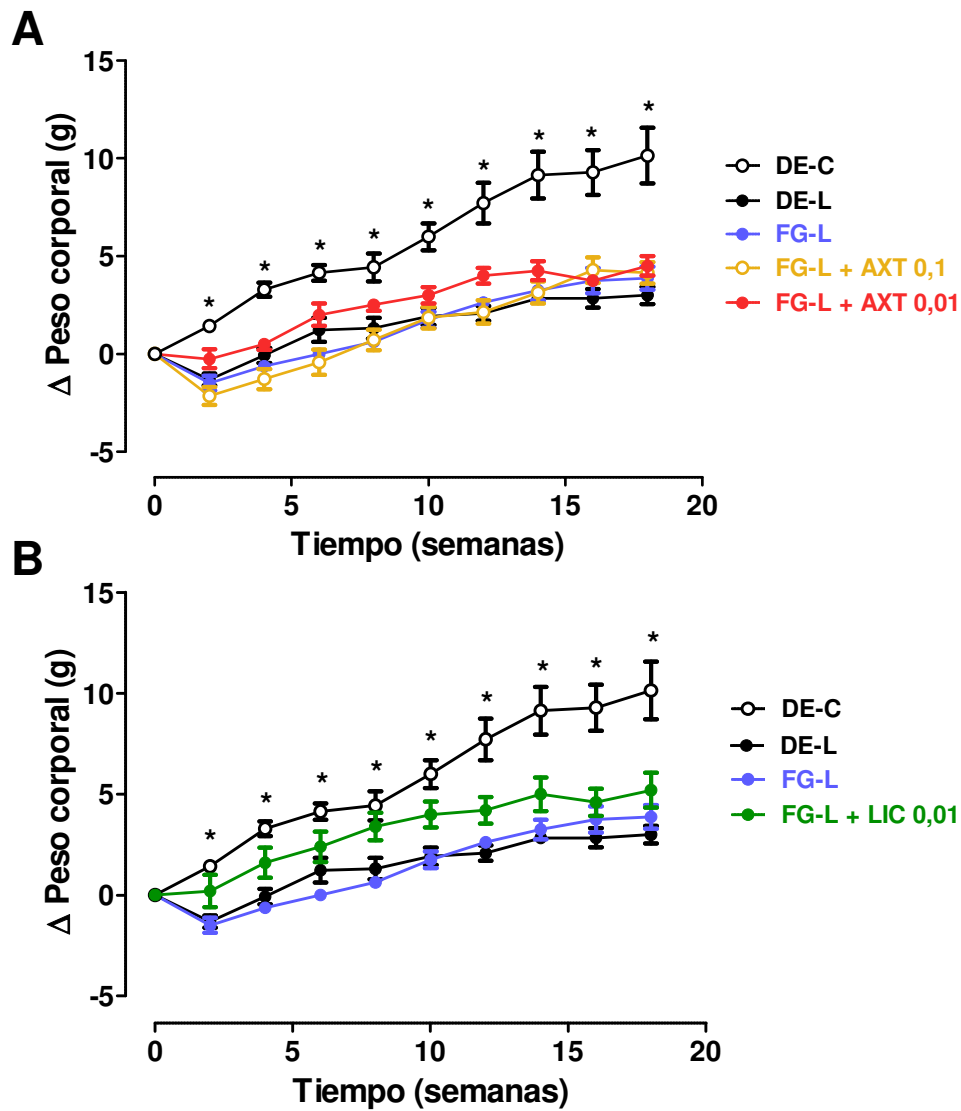


## PREVENCIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO EN RATONES

### 1. Peso corporal e ingesta calórica

El cambio de la dieta estándar comercial (PicoLab® Select Rodent 50IF/6F) por las dietas elaboradas en el laboratorio, tanto la estándar como la rica en fructosa y en grasa, produjeron una disminución del peso corporal en las primeras semanas del estudio, como se puede ver en la figura 23. Posteriormente y a lo largo del ensayo, se observó un lento incremento de este parámetro sin que el aumento del peso superara los 5 g en ninguno de los grupos. Sorprendentemente, no hubo diferencias entre el grupo que recibió la dieta estándar y el alimentado con la dieta rica en fructosa y en grasa. Además, los animales tratados con los carotenoides astaxantina y licopeno mantuvieron una evolución similar. Solo los ratones tratados con la dosis inferior de astaxantina y con licopeno experimentaron una menor reducción del peso corporal al inicio y presentaron un incremento del peso más rápido, aunque las diferencias no fueron significativas. El pienso comercial ocasionó una mayor ganancia de peso, superando en más de tres veces el incremento observado con la dieta estándar del laboratorio.

Los animales que recibieron la dieta comercial consumieron durante el estudio una media de  $3,5 \pm 0,2$  g de pienso. La ingesta en los grupos que fueron alimentados con las dietas elaboradas en el laboratorio siguió una tendencia a la baja, más acusada en los grupos que recibieron la dieta rica en fructosa y en grasa como se aprecia en la tabla 8. A pesar de estas diferencias, la ingesta calórica fue similar en todos los grupos. No se observaron diferencias en la ingesta de líquidos entre los grupos que fue en torno a 5 mL al día a lo largo del estudio.



**Figura 23.** Incremento del peso corporal en ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L) y rica en fructosa y en grasa (FG-L). **[A]** Efecto de la astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y **[B]** efecto del licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-L.

**Tabla 8.** Consumo diario de pienso e ingesta calórica.

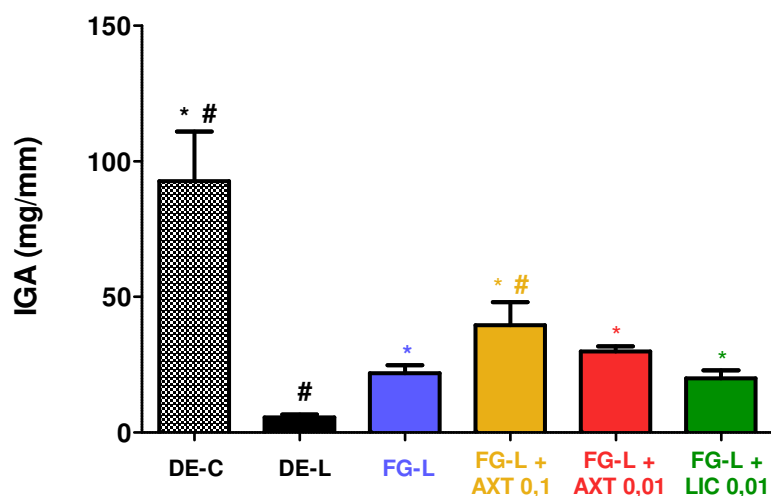
	Ingesta	
	Pienso (g)	Kcal/día
<b>DE-C</b>	3,5 ± 0,2	12,6 ± 0,7
<b>DE-L</b>	3,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,2 ± 2,0 <sup>a</sup>
<b>FG-L</b>	2,6 ± 0,1	12,7 ± 0,3
<b>FG-L + AXT 0,1</b>	2,7 ± 0,2	13,0 ± 0,8
<b>FG-L + AXT 0,01</b>	2,6 ± 0,0	12,9 ± 0,0
<b>FG-L + LIC 0,01</b>	2,9 ± 0,0	14,2 ± 0,0

Ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01).

<sup>a</sup>Valor aproximado teniendo en cuenta la disgregación del pienso.

## 2. Obesidad abdominal

Aunque no se encontraron diferencias en el peso corporal de los animales alimentados con dietas elaboradas en el laboratorio, hubo diferencias en la cantidad de grasa abdominal. El peso de la grasa abdominal fue mayor en el grupo que recibió la dieta rica en fructosa y en grasa (FG-L: 385 ± 56 mg) en comparación con su grupo control (DE-L: 81 ± 21 mg). En relación a los tratamientos con carotenoides también se vio un incremento de la grasa abdominal, siendo significativamente superior al grupo FG-L en el caso de los animales que recibieron la dosis más alta de astaxantina (713 ± 152 mg). De nuevo, el grupo alimentado con el pienso comercial presentó un comportamiento diferente, pues el peso de la grasa abdominal fue de 1628 ± 337 mg, veinte veces superior al del grupo DE-L. El IGA permite normalizar el peso de la grasa abdominal con la longitud de la tibia y es una medida del grado de obesidad abdominal (figura 24).



**Figura 24.** Índice de grasa abdominal (IGA) en ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-L, # $p < 0,05$  frente al grupo FG-L.

### 3. Presión arterial e hipertrofia cardíaca y renal

La presión arterial se determinó cada cuatro semanas. Como se aprecia en la tabla 9, donde se recogen los valores al inicio y al final del estudio, ni la alimentación rica en fructosa y en grasa ni los tratamientos modificaron estos valores.

Ninguna de las dietas elaboradas en el laboratorio modificó los índices de hipertrofia cardíaca y renal calculados respecto a la longitud de la tibia. El tratamiento concomitante con astaxantina o licopeno no produjo cambios significativos en estos índices. Los ratones alimentados con el pienso comercial mostraron una clara hipertrofia de estos órganos como puede verse por el incremento significativo de los índices de hipertrofia cardíaca y renal (tabla 9).

**Tabla 9.** Presión arterial sistólica (PAS) inicial y final (18 semanas) e índices de hipertrofia cardíaca (HC) y renal (HR)

	PAS (mmHg)		HC	HR
	Inicial	18 semanas	mg/mm	mg/mm
<b>DE-C</b>	100 ± 3	103 ± 3	7,0 ± 0,3*	10,8 ± 0,5*
<b>DE-L</b>	102 ± 2	103 ± 3	5,3 ± 0,2	8,3 ± 0,3
<b>FG-L</b>	102 ± 2	101 ± 3	5,4 ± 0,1	7,8 ± 0,2
<b>FG-L + AXT 0,1</b>	100 ± 2	99 ± 4	5,6 ± 0,2	9,1 ± 0,3
<b>FG-L + AXT 0,01</b>	97 ± 4	102 ± 3	5,3 ± 0,1	7,7 ± 0,3
<b>FG-L + LIC 0,01</b>	103 ± 3	101 ± 1	5,7 ± 0,2	8,5 ± 0,3

Ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \*p<0,05 frente al grupo DE-L.

#### 4. Tolerancia a la glucosa

Para evaluar la sensibilidad a la insulina se midió la glucemia basal y se llevó a cabo la prueba de tolerancia a la glucosa a las 8 y 18 semanas de estudio. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles sanguíneos de glucosa en ayunas a las 8 semanas. La glucemia basal a las 18 semanas también fue similar en todos los grupos experimentales, alcanzando valores en torno a 90 mg/dL (tabla 10). Sin embargo, el grupo que recibió una dieta rica en fructosa y en grasa (FG-L) presentó una disminución importante de la tolerancia a la glucosa administrada por vía intraperitoneal, tanto a las 8 como a las 18 semanas de estudio (figuras 25 y 26). Aunque todos los grupos alcanzaron un pico de glucemia a los 30 minutos de administrar la sobrecarga de glucosa, el grupo DE-L experimentó un menor incremento. El tratamiento con astaxantina o licopeno no mejoró la tolerancia a la

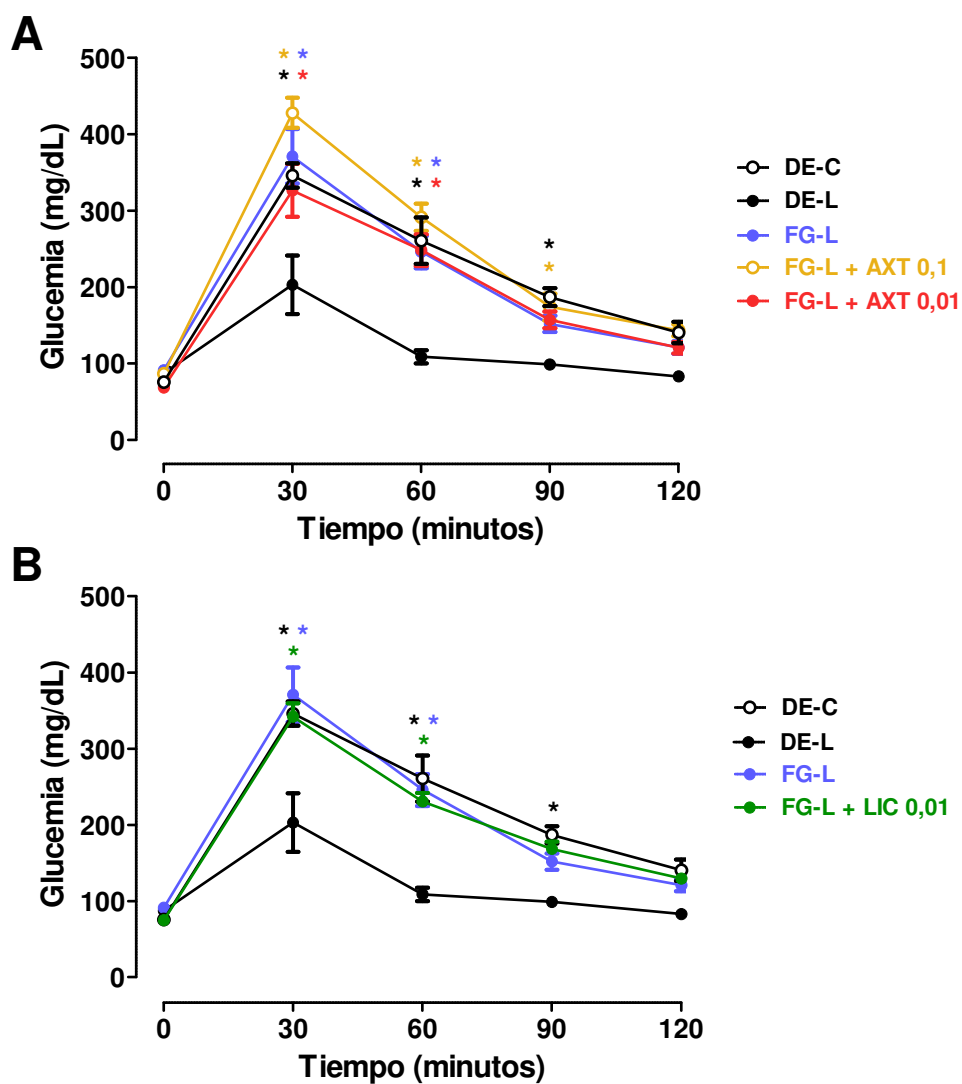
glucosa y el comportamiento fue similar al grupo FG-L. Al igual que en otras determinaciones, se observaron diferencias entre los animales que recibieron las dietas estándar. El grupo alimentado con la dieta estándar comercial se comportó como el grupo que recibió la dieta rica en fructosa y en grasa elaborada en el laboratorio.

Las curvas de tolerancia a la glucosa obtenidas a las 8 semanas y al finalizar el ensayo siguen un patrón similar, si bien se observó mayor resistencia a la insulina a las 18 semanas, con un pico de glucemia más alto a los 30 minutos de la administración de la glucosa y una recuperación de la glucemia hasta niveles basales más lenta. En la figura 27 se muestra el ABC que ilustra estos resultados.

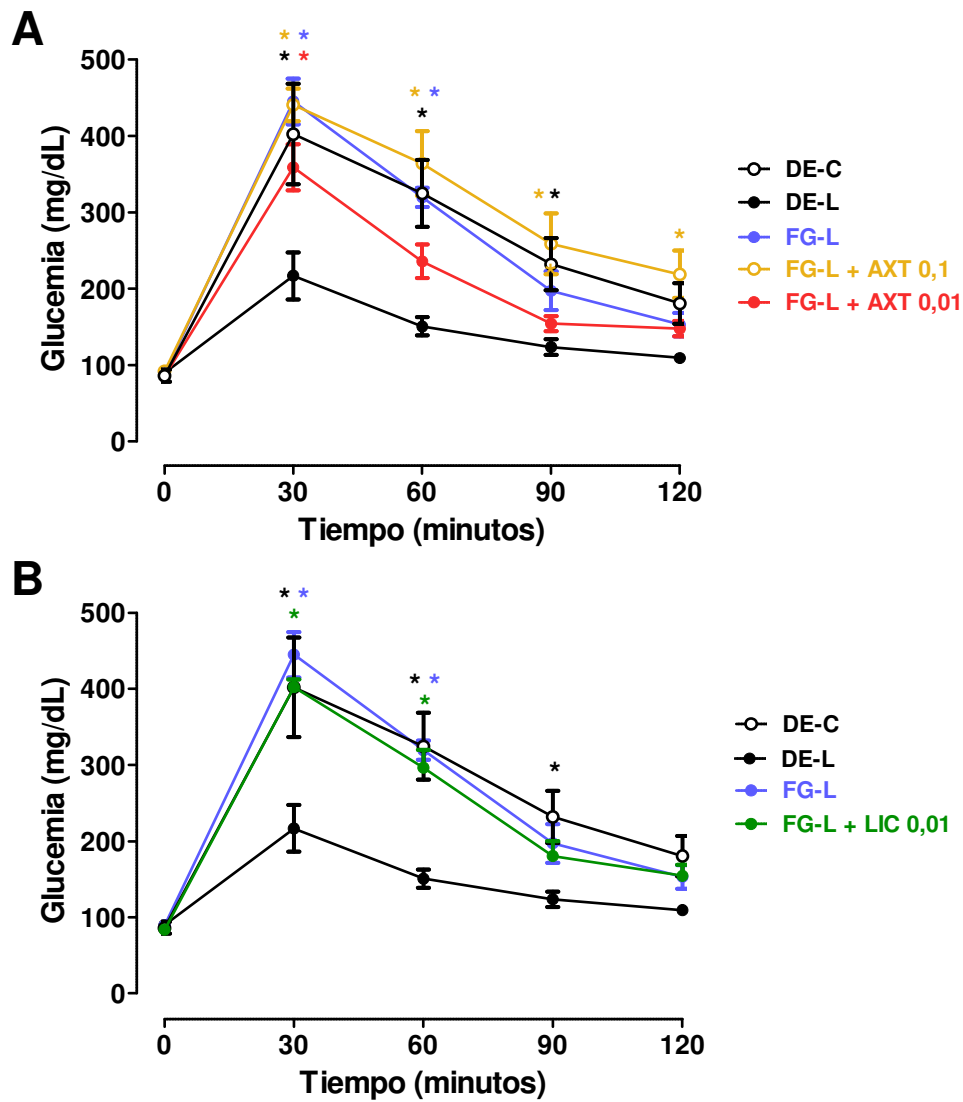
### **5. Determinación del perfil lipídico en plasma**

Como reflejan los datos de la tabla 11 al finalizar el estudio los animales alimentados durante 18 semanas con una dieta rica en fructosa y grasa presentaron unos niveles de CT dos veces superiores a los obtenidos en aquellos que recibieron la dieta estándar elaborada en el laboratorio. Además, se observó un incremento paralelo de los niveles de HDLc y LDLc. Los niveles de TG fueron similares en ambos grupos. El tratamiento con los carotenoides no modificó el perfil lipídico respecto al grupo FG-L no tratado.

En los animales alimentados con la dieta estándar comercial se observó, de nuevo, un comportamiento diferente al grupo DE-L. En este caso, existe un aumento de los niveles de TG y HDLc y un descenso de los valores de LDLc que hacen que el IA sea significativamente inferior que en los grupos de animales que recibieron la alimentación elaborada en el laboratorio.



**Figura 25.** Prueba de tolerancia a la glucosa a las 8 semanas de estudio en ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L) y rica en fructosa y en grasa (FG-L). **[A]** Efecto de la astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y **[B]** efecto del licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-L.



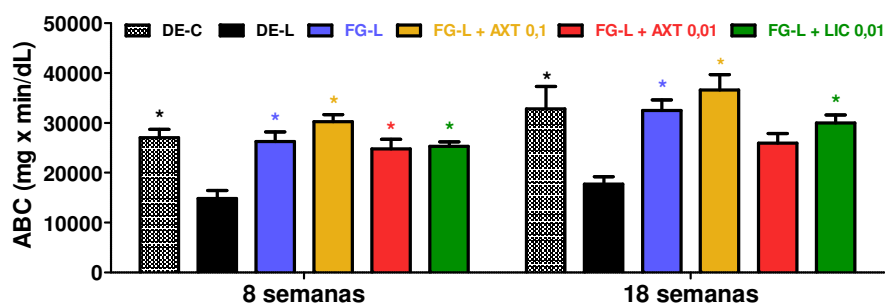
**Figura 26.** Prueba de tolerancia a la glucosa a las 18 semanas de estudio en ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L) y rica en fructosa y en grasa (FG-L). **[A]** Efecto de la astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y **[B]** efecto del licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-L.



**Tabla 10.** Glucemia basal en ayunas a las 8 y 18 semanas.

	8 semanas	18 semanas
	mg/dL	mg/dL
DE-C	76 ± 2	86 ± 8
DE-L	87 ± 7	90 ± 3
FG-L	91 ± 5	89 ± 5
FG-L + AXT 0,1	86 ± 6	92 ± 7
FG-L + AXT 0,01	69 ± 2	86 ± 4
FG-L + LIC 0,01	75 ± 3	84 ± 3

Ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01).



**Figura 27.** Área bajo la curva (ABC) de la prueba de tolerancia a la glucosa a las 8 y 18 semanas de estudio en ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \*p<0,05 frente al grupo DE-L.

**Tabla 11.** Niveles plasmáticos de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDLc), colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDLc) e índice aterogénico (IA).

	TG	CT	HDLc	LDLc	IA
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	-
<b>DE-C</b>	51 ± 4*	87 ± 9	50 ± 6*	21 ± 4*	1,8 ± 0,1*
<b>DE-L</b>	39 ± 3	73 ± 9	16 ± 3	49 ± 6	4,8 ± 0,2
<b>FG-L</b>	43 ± 3	151 ± 11*	31 ± 2*	112 ± 10*	4,8 ± 0,2
<b>FG-L + AXT 0,1</b>	42 ± 2	163 ± 10*	36 ± 2*	118 ± 9*	4,5 ± 0,3
<b>FG-L + AXT 0,01</b>	44 ± 2	168 ± 7*	35 ± 2*	124 ± 6*	4,8 ± 0,2
<b>FG-L + LIC 0,01</b>	43 ± 3	192 ± 18*	34 ± 3*	150 ± 15*	5,7 ± 0,3

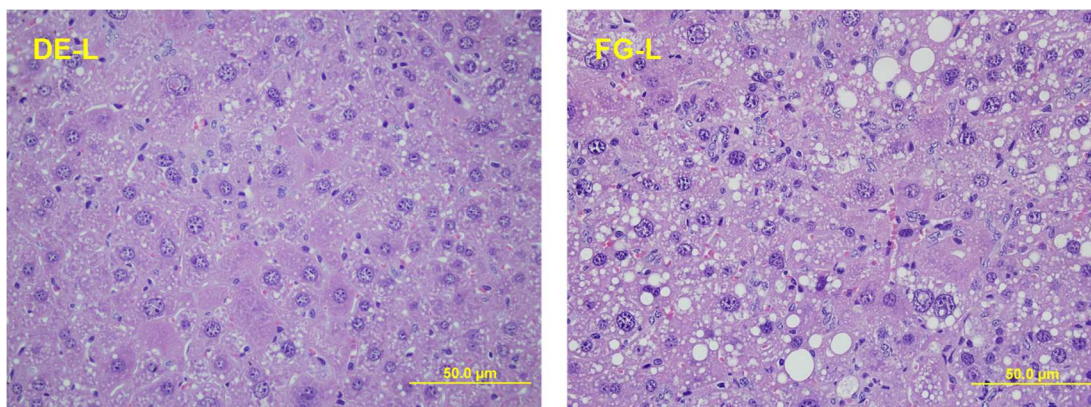
Ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \*p<0,05 frente al grupo DE-L.

## 6. Morfometría e histología del hígado

El peso del hígado fue significativamente inferior en los ratones alimentados con la dieta estándar comercial a pesar de presentar un mayor incremento del peso corporal que los animales que recibieron piensos elaborados en el laboratorio, por lo que la relación que se establece entre el peso del hígado y la longitud de la tibia es menor en el grupo DE-C (DE-C, 62,4 ± 3,7; DE-L, 80,4 ± 4,8; FG-L, 86,6 ± 3,4; FG-L + AXT 0,1, 93,0 ± 3,6; FG-L + AXT 0,01, 77,6 ± 1,2; FG-L + LIC 0,01, 93,3 ± 2,4).

Se llevó a cabo el análisis cualitativo de cortes histológicos de hígado de los grupos de animales que recibieron las dietas estándar y la dieta rica en fructosa y en grasa (figura 28). Aunque la estructura celular y la arquitectura hepática están conservadas, se aprecian algunas microvesículas grasas a lo largo de la preparación

en el grupo DE-L. Sin embargo, los cortes de hígado de los animales alimentados con la dieta rica en fructosa y en grasa presentan una marcada esteatosis macrovesicular, pues están presentes abundantes gotas de grasa de gran tamaño en el interior de los hepatocitos. No se observa infiltrado lobulillar o portal, por lo que no hay signos de daño hepatocelular ni fibrosis.



**Figura 28.** Fotografías de cortes histológicos de hígados teñidos, con hematoxilina-eosina, de ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar elaboradas en el laboratorio (DE-L) y dieta rica en fructosa y en grasa (FG-L).

## 7. Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático

La actividad de las enzimas ALT y AST puede indicar un daño hepatocelular. No hubo diferencias en la actividad de ambas aminotransferasas en los grupos alimentados con dietas elaboradas en el laboratorio. Sorprendentemente, la actividad de estas enzimas fue significativamente inferior en el grupo que recibió la dieta comercial (tabla 12).

**Tabla 12.** Actividad de alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).

	ALT	AST
	UI/L	UI/L
<b>DE-C</b>	15 ± 2*	60 ± 8*
<b>DE-L</b>	170 ± 32	133 ± 28
<b>FG-L</b>	121 ± 24	100 ± 19
<b>FG-L + AXT 0,1</b>	175 ± 36	131 ± 24
<b>FG-L + AXT 0,01</b>	124 ± 19	102 ± 13
<b>FG-L + LIC 0,01</b>	111 ± 19	105 ± 10

Ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \*p<0,05 frente al grupo DE-L.

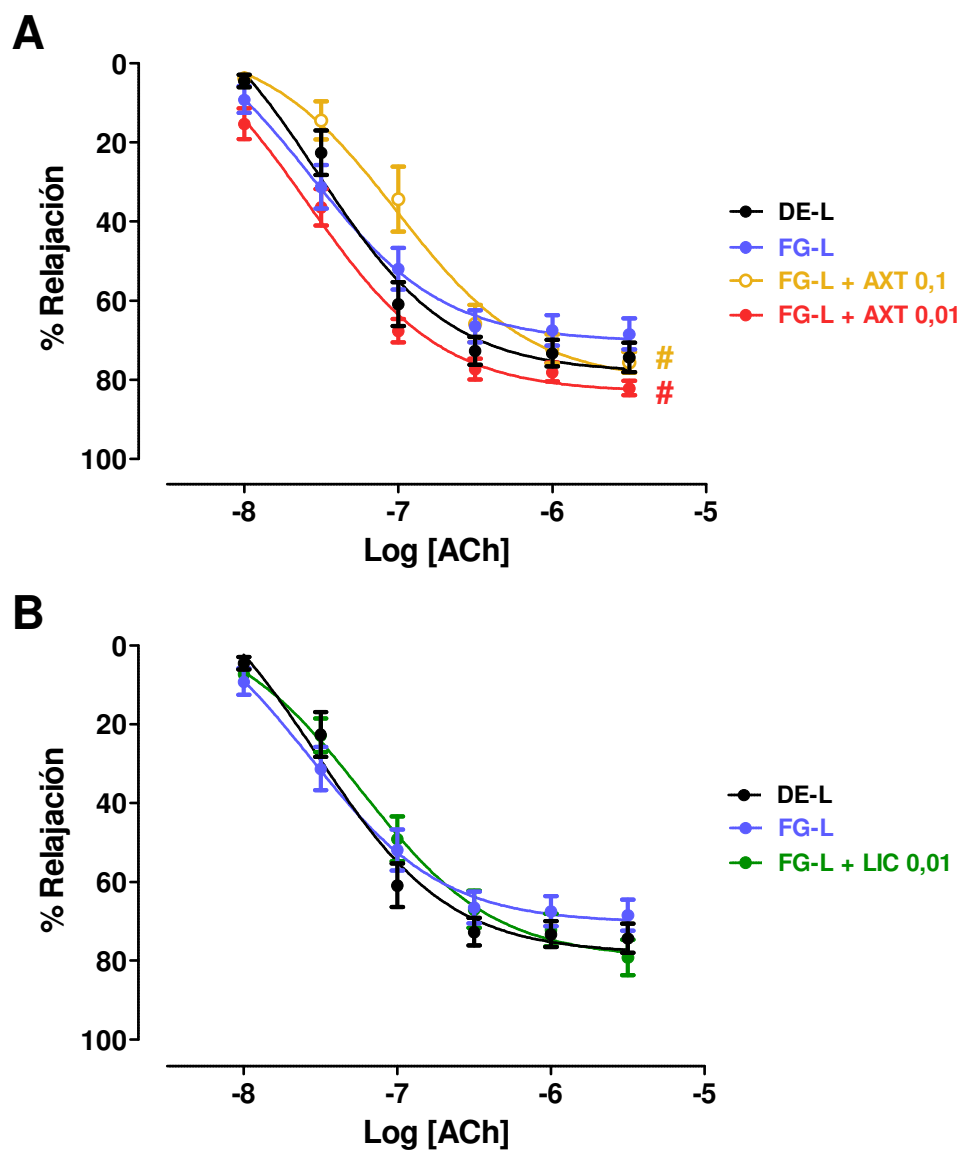
## 8. Estudios de funcionalidad en arteria aorta

Las curvas concentración-respuesta de ACh fueron similares en los anillos procedentes del grupo control (ratones alimentados con la dieta estándar elaborada en el laboratorio) y los que se obtuvieron de aquéllos con fructosa y grasa (figura 29). El tratamiento con licopeno no modificó la relajación, pero los anillos de animales que recibieron astaxantina presentaron un comportamiento diferente en función de la dosis. La dosis más alta de astaxantina produjo un desplazamiento de la curva a la derecha, disminuyendo la sensibilidad a ACh y la dosis inferior aumentó el Emax. Por otra parte, no hubo diferencias ni en el Emax ni en el pD<sub>2</sub> entre las dos dietas estándar empleadas (tabla 13).

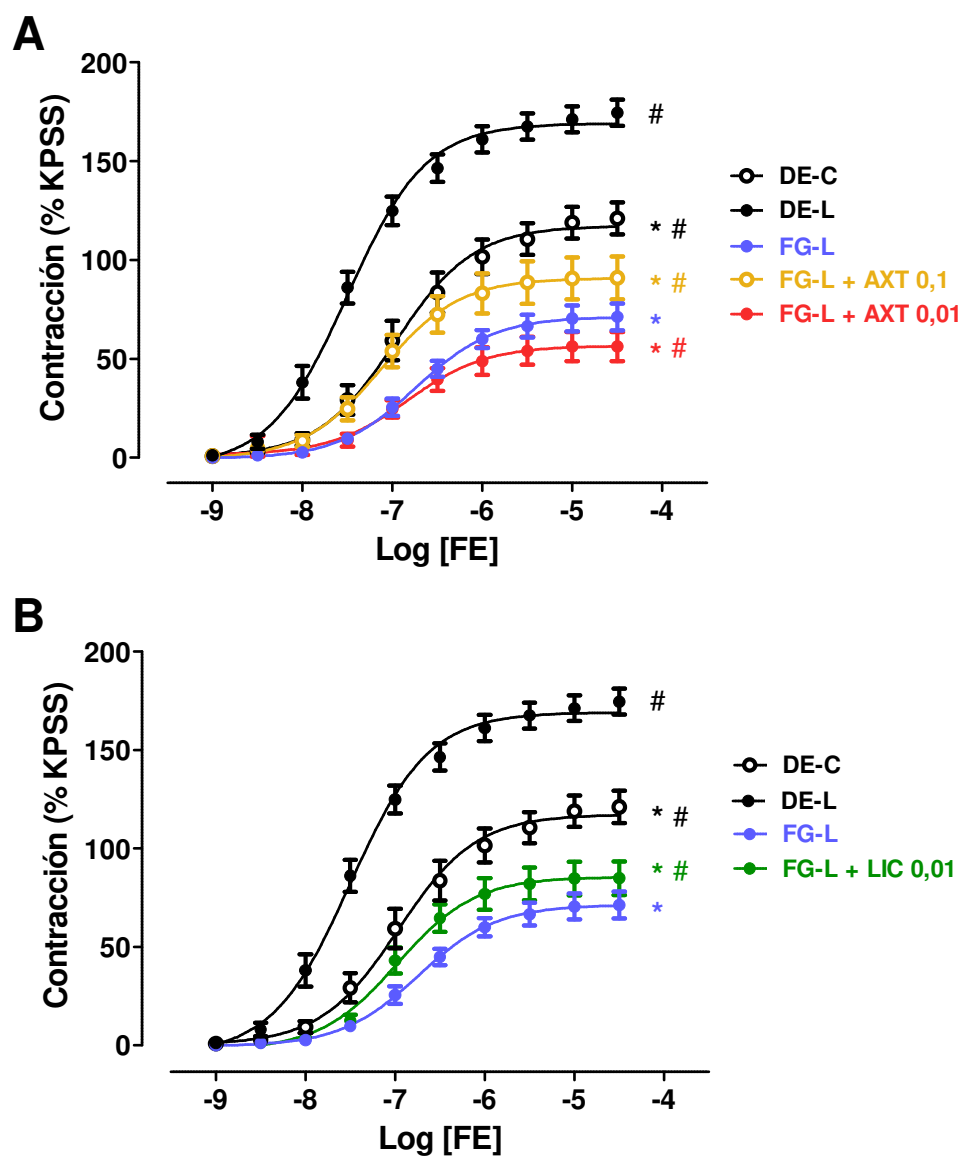
Las diferencias más importantes en la funcionalidad vascular se obtuvieron en la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica (figura 30 y tabla 13). Se observó una marcada reducción

de la respuesta contráctil mediada por FE en ratones alimentados con la dieta rica en fructosa y en grasa. Los anillos de animales tratados con la dosis alta de astaxantina o con licopeno mostraron una ligera recuperación de la respuesta mientras que la dieta con menor proporción de astaxantina produjo una pérdida aún mayor que la observada en el grupo FG-L. Además, la diferencia entre los grupos alimentados con dietas estándar se puso de nuevo de manifiesto. En los anillos de ratones del grupo DE-C se obtuvo una respuesta intermedia entre la observada con las dietas estándar y rica en fructosa y en grasa elaboradas en el laboratorio.

El potasio produce una despolarización no mediada por receptores que induce una contracción debido a la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes. Aunque no hubo diferencias en la respuesta entre los diferentes grupos que recibieron las dietas elaboradas en el laboratorio, la contracción fue significativamente menor en el grupo alimentado con la dieta estándar comercial (tabla 13).



**Figura 29.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-6}$  M) en anillos de arteria aorta, precontraídos con fenilefrina, de ratones C57BL/6J alimentados con dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L) y rica en fructosa y en grasa (FG-L). **[A]** Efecto de la astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y **[B]** efecto del licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). # $p < 0,05$  frente al grupo FG-L.



**Figura 30.** Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (FE,  $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria aorta de ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L) y rica en fructosa y en grasa (FG-L). **[A]** Efecto de la astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y **[B]** efecto del licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-L. # $p < 0,05$  frente al grupo FG-L.

## Resultados

**Tabla 13.** Valores de respuesta máxima ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$  de las curvas de acetilcolina (ACh), fenilefrina (FE) y valores de contracción a solución hiperpotásica (KPSS, 120 mM) en anillos de arteria aorta.

	ACh		FE		KPSS
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	mN
<b>DE-C</b>	74,0 ± 4,1	7,3 ± 0,1	121,2 ± 8,2*	7,0 ± 0,1	2,5 ± 0,3*
<b>DE-L</b>	79,0 ± 4,5	7,5 ± 0,1	174,6 ± 6,6	7,5 ± 0,1	4,9 ± 0,4
<b>FG-L</b>	65,5 ± 4,0	7,6 ± 0,2	71,3 ± 6,8*	6,7 ± 0,1	4,3 ± 0,2
<b>FG-L + AXT 0,1</b>	75,6 ± 2,6	7,0 ± 0,1*#	91,0 ± 10,8*	7,1 ± 0,2	4,3 ± 0,3
<b>FG-L + AXT 0,01</b>	76,0 ± 5,6#	7,7 ± 0,2	56,3 ± 7,3*	6,8 ± 0,2	4,9 ± 0,4
<b>FG-L + LIC 0,01</b>	79,2 ± 4,5	7,2 ± 0,1	84,9 ± 8,6*	7,0 ± 0,1	4,7 ± 0,6

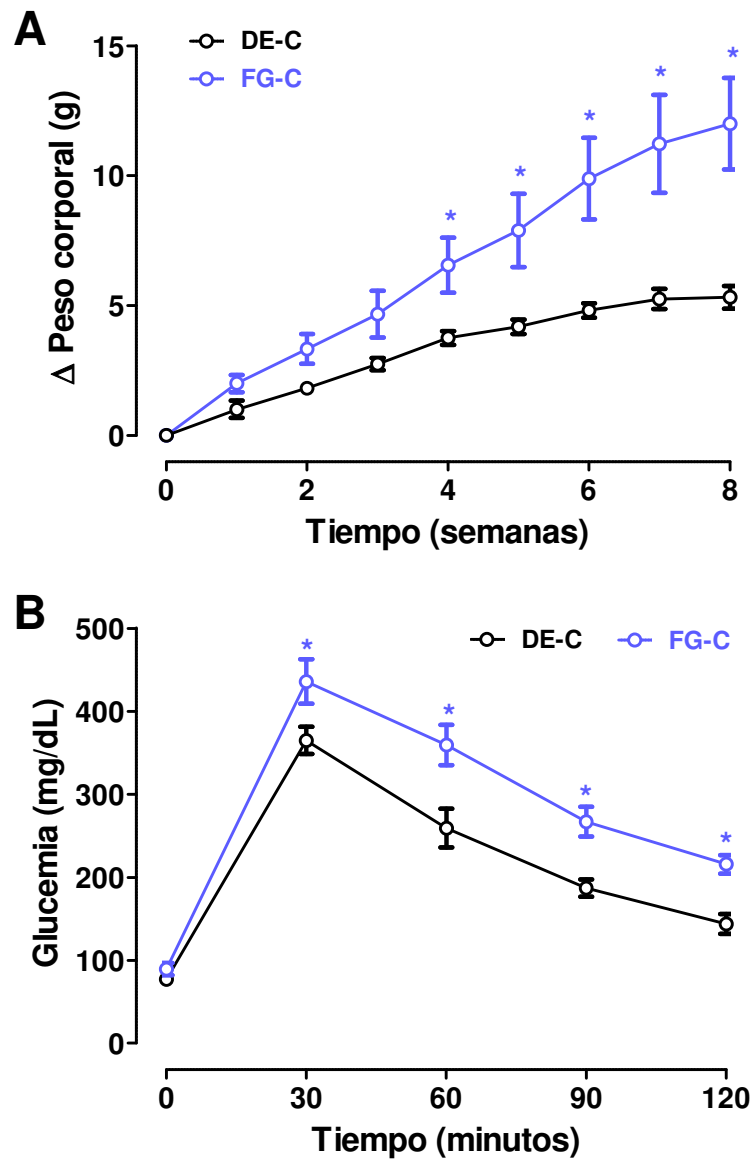
Ratones C57BL/6J alimentados con dieta estándar comercial (DE-C) y dietas elaboradas en el laboratorio: estándar (DE-L), rica en fructosa y en grasa (FG-L), rica en fructosa y en grasa suplementada con astaxantina 0,1% (FG-L + AXT 0,1) o 0,01% (FG-L + AXT 0,01) y rica en fructosa y en grasa suplementada con licopeno 0,01% (FG-L + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-L. # $p < 0,05$  frente al grupo FG-L.



## TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO EN RATONES

Con el SM que se desarrolló con las dietas diseñadas por nosotros se obtuvieron cambios en algunos parámetros (grasa abdominal, tolerancia a la glucosa, CT plasmático y esteatosis hepática) pero nos sorprendió la ausencia de modificaciones en el peso corporal y en la glucemia basal. El comportamiento observado en el grupo que recibió la dieta estándar comercial también fue llamativo, siendo más parecido al descrito con la dieta rica en fructosa y en grasa que al obtenido con la dieta estándar elaborada en el laboratorio. Estos resultados nos llevaron a plantear un nuevo ensayo empleando la dieta comercial suplementada con fructosa y grasa, pensando que el SM se desarrollaría antes y con mayor intensidad si empleábamos esta dieta como base. Para preparar esta dieta, se añade al pienso comercial manteca de cerdo y fructosa en la misma proporción que la utilizada en el estudio anterior. Como se indicó en la metodología, el contenido calórico y la contribución de las grasas al contenido calórico final son similares en ambas dietas enriquecidas en fructosa y en grasa mientras que la contribución de los hidratos de carbono es aproximadamente un 16% superior en el pienso elaborado a partir de la dieta comercial.

Puesto que en el ensayo anterior la astaxantina y el licopeno no fueron capaces de prevenir el desarrollo de SM, en este caso, se estudió si podrían revertir o mejorar algunos de los parámetros metabólicos y bioquímicos que se encuentran alterados cuando el SM está ya instaurado. Antes de iniciar el tratamiento, en los grupos control, se controlaron parámetros como el peso, la presión arterial y la glucemia. Como se puede observar en la figura 31-A, a partir de las 4 semanas de estudio comienzan a aparecer diferencias significativas en el peso entre el grupo que recibió la dieta estándar y el alimentado con la dieta rica en fructosa y en grasa; esta diferencia se incrementó con el tiempo. La glucemia basal a las 8 semanas es ligeramente superior en el grupo alimentado con la dieta enriquecida en fructosa y en grasa, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (DE-C,  $77 \pm 2$ ; FG-C,  $89 \pm 7$  mg/dL,  $p > 0,05$ ). Este grupo también presentó una marcada disminución de la tolerancia a la glucosa, como se aprecia en la figura 31-B y en los valores de ABC (DE-C,  $27.636 \pm 1.333$ ; FG-C,  $36.424 \pm 1774$  mg x min/dL,  $p < 0,05$ ).



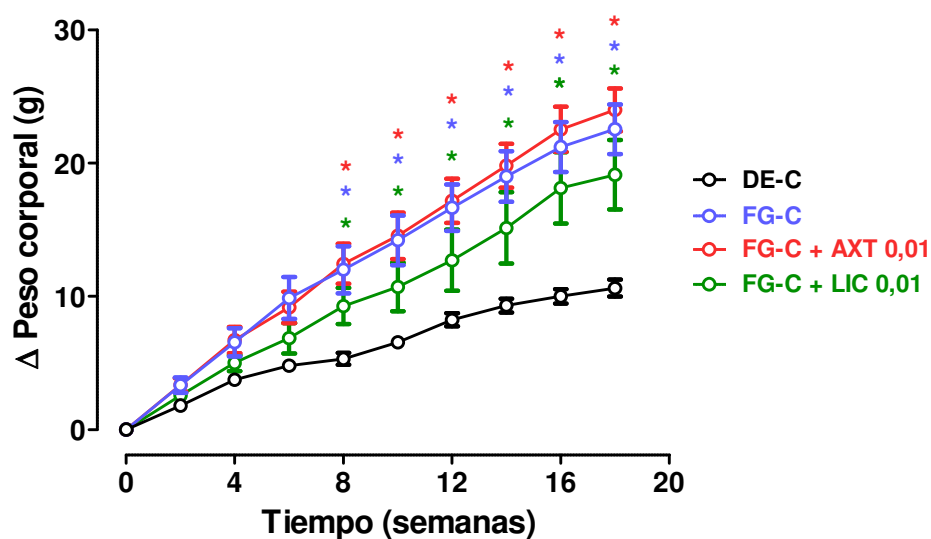
**Figura 31.** Incremento del peso corporal **[A]** y prueba de tolerancia a la glucosa a las 8 semanas de estudio **[B]** en ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida con fructosa y grasa (FG-C). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.

Después de 8 semanas alimentando a los animales con la dieta enriquecida en fructosa y en grasa consideramos instaurado el SM; se inició el tratamiento con astaxantina y licopeno durante 10 semanas. La astaxantina o el licopeno se incorporan al pienso en un porcentaje del 0,01% para cada uno de los carotenoides.

En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos durante el tratamiento con los carotenoides y al finalizar el estudio, a las 18 semanas.

## 1. Peso corporal e ingesta calórica

La dieta enriquecida con fructosa y grasa produjo un incremento del peso corporal progresivo, muy superior al observado con la dieta estándar. Los animales tratados con los carotenoides astaxantina y licopeno presentaron un incremento de peso que no fue significativamente diferente al grupo FG-C (figura 32).



**Figura 32.** Incremento del peso corporal en ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.

## Resultados

No hubo diferencias significativas en la ingesta de pienso, aunque en los grupos alimentados con la dieta rica en fructosa y en grasa aumentó ligeramente a partir de la octava semana. Como el contenido calórico de la dieta enriquecida con fructosa y con grasa es superior, los animales que recibieron esta dieta consumieron más calorías que los alimentados con la dieta estándar (tabla 14). Como se indicó en el ensayo anterior, no se observaron diferencias en el consumo de agua.

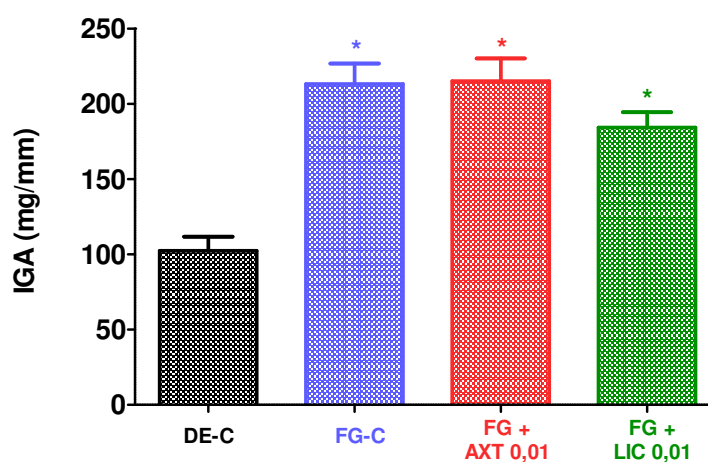
**Tabla 14.** Consumo diario de pienso e ingesta calórica.

		Ingesta	
		Pienso (g)	Kcal/día
<b>DE-C</b>	8 semanas	3,5 ± 0,2	12,4 ± 0,7
	8-18 semanas	3,5 ± 0,2	12,7 ± 0,8
<b>FG-C</b>	8 semanas	3,1 ± 0,1	14,6 ± 0,5*
	8-18 semanas	3,5 ± 0,1	16,2 ± 0,7*
<b>FG-C + AXT 0,01</b>	8 semanas	3,2 ± 0,0	14,9 ± 0,2*
	8-18 semanas	3,4 ± 0,1	15,7 ± 0,3*
<b>FG-C + LIC 0,01</b>	8 semanas	3,2 ± 0,1	15,2 ± 0,5*
	8-18 semanas	3,4 ± 0,2	16,2 ± 0,9*

Ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \*p<0,05 frente al grupo DE-C.

## 2. Obesidad abdominal

El peso de la grasa abdominal fue mayor en el grupo que recibió la dieta rica en fructosa y en grasa ( $3.581 \pm 238$  mg) en comparación con el grupo DE-C ( $1.761 \pm 168$  mg). El tratamiento con carotenoides no logró reducir este parámetro indicador de SM, siendo el peso de la grasa de  $3.684 \pm 264$  mg en el grupo tratado con astaxantina y de  $3.133 \pm 173$  mg en los animales tratados con licopeno. En la figura 33 se representa el IGA.



**Figura 33.** Índice de grasa abdominal (IGA) en ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.

### 3. Presión arterial e hipertrofia cardíaca y renal

Al finalizar el tratamiento se midió la PAS y, como se observa en la tabla 15, no hubo diferencias entre los grupos estudiados. La dieta rica en fructosa y en grasa tampoco produjo cambios macroscópicos en el remodelado del corazón o del riñón, como reflejan los valores de hipertrofia cardíaca y renal, calculados respecto a la longitud de la tibia, resultados que concuerdan con la ausencia de cambios en la presión arterial.

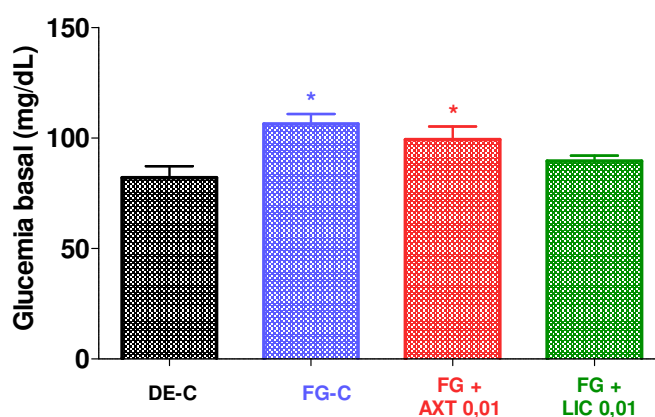
**Tabla 15.** Presión arterial sistólica (PAS) e índices de hipertrofia cardíaca (HC) y renal (HR).

	PAS	HC	HR
	mmHg	mg/mm	mg/mm
<b>DE-C</b>	94 ± 1	7,4 ± 0,3	11,3 ± 0,4
<b>FG-C</b>	93 ± 2	7,6 ± 0,3	10,8 ± 0,4
<b>FG-C + AXT 0,01</b>	94 ± 2	7,0 ± 0,3	10,6 ± 0,2
<b>FG-C + LIC 0,01</b>	93 ± 2	7,3 ± 0,2	11,2 ± 0,4

Ratones alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \*p<0,05 frente al grupo DE-C.

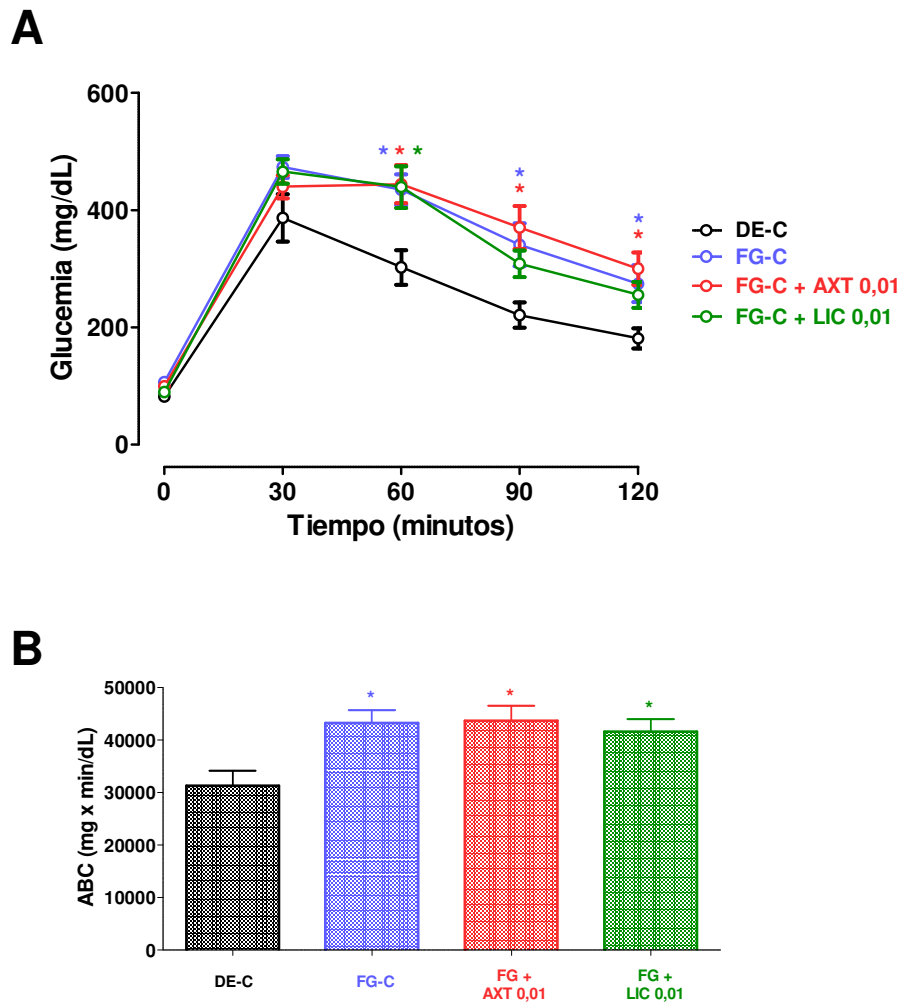
#### 4. Tolerancia a la glucosa

La glucemia basal en ayunas a las 18 semanas de estudio fue significativamente superior en el grupo de animales alimentados con la dieta rica en fructosa y en grasa (figura 34). El tratamiento con astaxantina no modificó los niveles sanguíneos de glucosa mientras que el licopeno logró reducirlos a valores similares a los del grupo control.



**Figura 34.** Glucemia basal en ayunas a las 18 semanas de estudio en ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.

La administración intraperitoneal de una dosis alta de glucosa dio lugar a un pico de glucemia a los 30 minutos, igual en todos los grupos alimentados con la dieta rica en fructosa y grasa y ligeramente más bajo en los animales control (figura 35-A). Las diferencias más importantes se observaron en las determinaciones posteriores, con una recuperación más lenta de los niveles sanguíneos de glucosa. De hecho, la glucemia a las 2 horas de la administración se mantuvo por encima de los 250 mg/dL. El tratamiento con los carotenoides no produjo cambios importantes en los valores de glucemia que presentaron un perfil semejante al grupo FG-C. En la figura 35-B se muestran los valores del ABC que reflejan la resistencia a la insulina que presentan los ratones con SM.



**Figura 35.** Prueba de tolerancia a la glucosa a las 18 semanas de estudio **[A]** y área bajo la curva calculada (ABC) a partir de la curva de glucemia frente al tiempo **[B]** en ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.



## 5. Determinación del perfil lipídico en plasma

Como se aprecia en la tabla 16 al finalizar el estudio los animales que recibieron la dieta rica en fructosa y en grasa presentaron niveles de TG y CT superiores a los obtenidos en los ratones alimentados con la dieta estándar comercial. Además, se observó un aumento ligero de los niveles de HDLc y más importante de los niveles de LDLc. Ninguno de estos parámetros mejoró con la incorporación de los carotenoides en la dieta. El IA fue similar en todos los grupos estudiados.

**Tabla 16.** Niveles plasmáticos de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol asociado a lipoproteínas alta densidad (HDLc) y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDLc) e índice aterogénico (IA).

	TG	CT	HDLc	LDLc	IA
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	-
<b>DE-C</b>	50 ± 3	90 ± 6	49 ± 4	26 ± 4	1,9 ± 0,1
<b>FG-C</b>	65 ± 4*	148 ± 9*	65 ± 5*	61 ± 5*	2,3 ± 0,1
<b>FG-C + AXT 0,01</b>	68 ± 6*	161 ± 8*	65 ± 3*	74 ± 10*	2,5 ± 0,1
<b>FG-C + LIC 0,01</b>	75 ± 7*	148 ± 6*	67 ± 2*	56 ± 7*	2,2 ± 0,1

Ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \*p<0,05 frente al grupo DE-C.

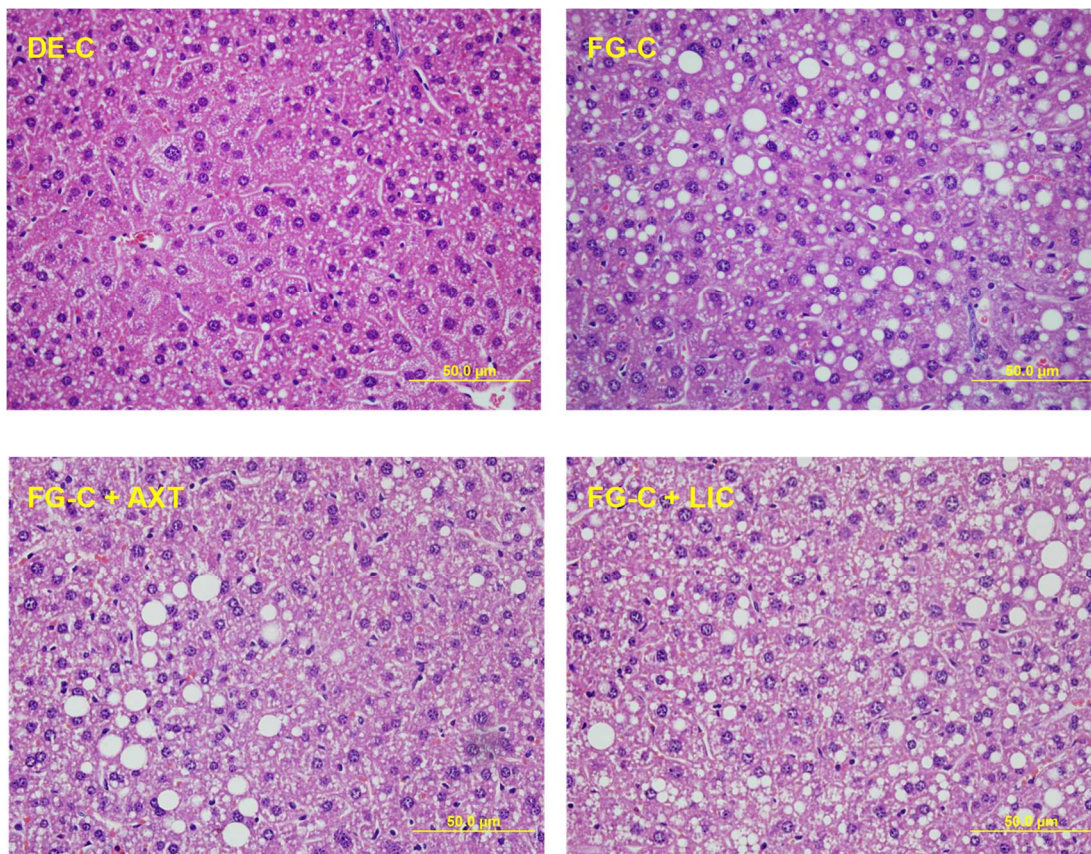
## **6. Morfometría e histología del hígado**

El peso del hígado fue significativamente superior en los animales que recibieron una dieta rica en fructosa y en grasa, por lo que la relación entre el peso del hígado y la longitud de la tibia (mg/mm), considerada como índice de hipertrofia hepática, aumentó en esos grupos (DE-C,  $65,6 \pm 2,0$ ; FG-C,  $80,7 \pm 6,7$ ; FG-C + AXT 0,01,  $87,0 \pm 6,7$ ; y FG-C + LIC 0,01,  $77,5 \pm 6,9$ ;  $p < 0,05$  frente al grupo DE-C).

El análisis cualitativo de cortes histológicos de hígado muestra que la dieta rica en fructosa y en grasa produce una intensa esteatosis macrovesicular, pues se aprecian abundantes gotas de grasa de gran tamaño a lo largo de la preparación (figura 36). Estas vesículas también están presentes en los cortes de hígados de ratones tratados con los dos carotenoides estudiados. Por otra parte, no hay signos de daño hepatocelular ni fibrosis. La cuantificación de la esteatosis hepática se muestra en la figura 37.

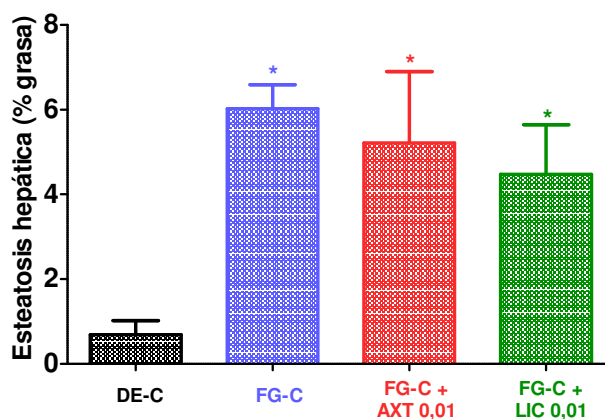
## **7. Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático**

La actividad de AST no se modificó ni por la dieta ni por el tratamiento con los carotenoides. Los resultados respecto a la actividad de ALT fueron más variables obteniéndose valores más altos en todos los animales alimentados con fructosa y con grasa, independientemente que su dieta estuviera suplementada o no con carotenoides. Los valores del grupo DE-C fueron menores, aunque no lo suficiente para dar lugar a diferencias estadísticamente significativas (tabla 17).



**Figura 36.** Fotografías de cortes histológicos de hígados teñidos con hematoxilina-eosina de ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC).

## Resultados



**Figura 37.** Grado de esteatosis hepática de ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.

**Tabla 17.** Actividad de alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).

	ALT	AST
	UI/L	UI/L
DE-C	13 ± 2	53 ± 7
FG-C	54 ± 21	59 ± 14
FG-C + AXT 0,01	48 ± 18	54 ± 12
FG-C + LIC 0,01	40 ± 20	57 ± 17

Ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01).

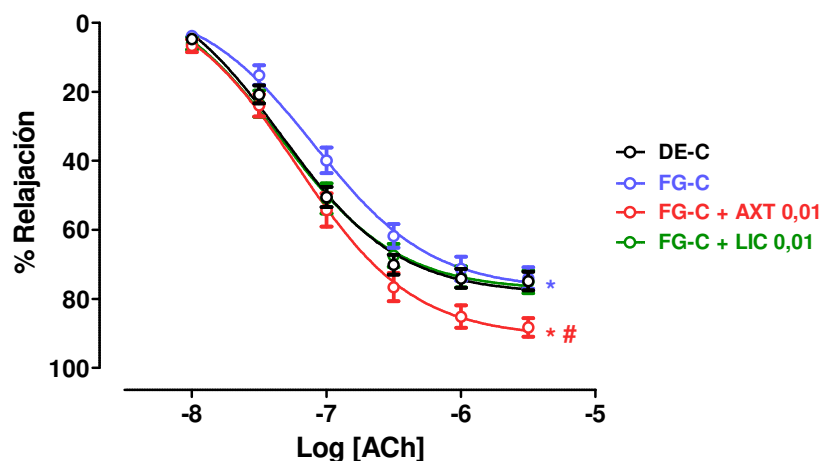
## 8. Estudios de funcionalidad en arteria aorta

En los estudios de funcionalidad se ponen de manifiesto diferencias en las curvas concentración-respuesta a ACh. Podemos observar una disminución significativa en la sensibilidad a este agonista colinérgico en los anillos de animales que recibieron la dieta rica en fructosa y grasa que se manifiesta por un ligero desplazamiento de la curva hacia la derecha y una disminución del valor de  $pD_2$  (figura 38 y tabla 18). El tratamiento con ambos carotenoides revierte la pérdida de sensibilidad; los anillos de animales tratados con astaxantina también mostraron un aumento del  $E_{max}$ .

En relación a la respuesta contracturante, no hubo diferencias en la contracción inducida por una solución hiperpotásica entre los diferentes grupos, pero se detectaron cambios importantes en la respuesta contráctil mediada por receptor. Se observó una reducción de la contracción a FE y 5-HT en ratones alimentados con la dieta rica en fructosa y en grasa (figura 39 y tabla 19). En los grupos con dieta suplementada con licopeno o astaxantina las respuestas también fueron significativamente menores que las del control. En el caso de la respuesta a 5-HT, ambos carotenoides recuperaron parcialmente la contractilidad aunque no alcanzaron los valores del grupo control.

En algunos anillos se repitió la curva de FE después de la inhibición de la NOS con L-NAME  $10^{-4}$  M. En estas condiciones, se observó un aumento de la contracción en todos los grupos, aunque las diferencias entre el grupo control y el de FG-C no se incrementaron (figura 40 y tabla 20).

## Resultados

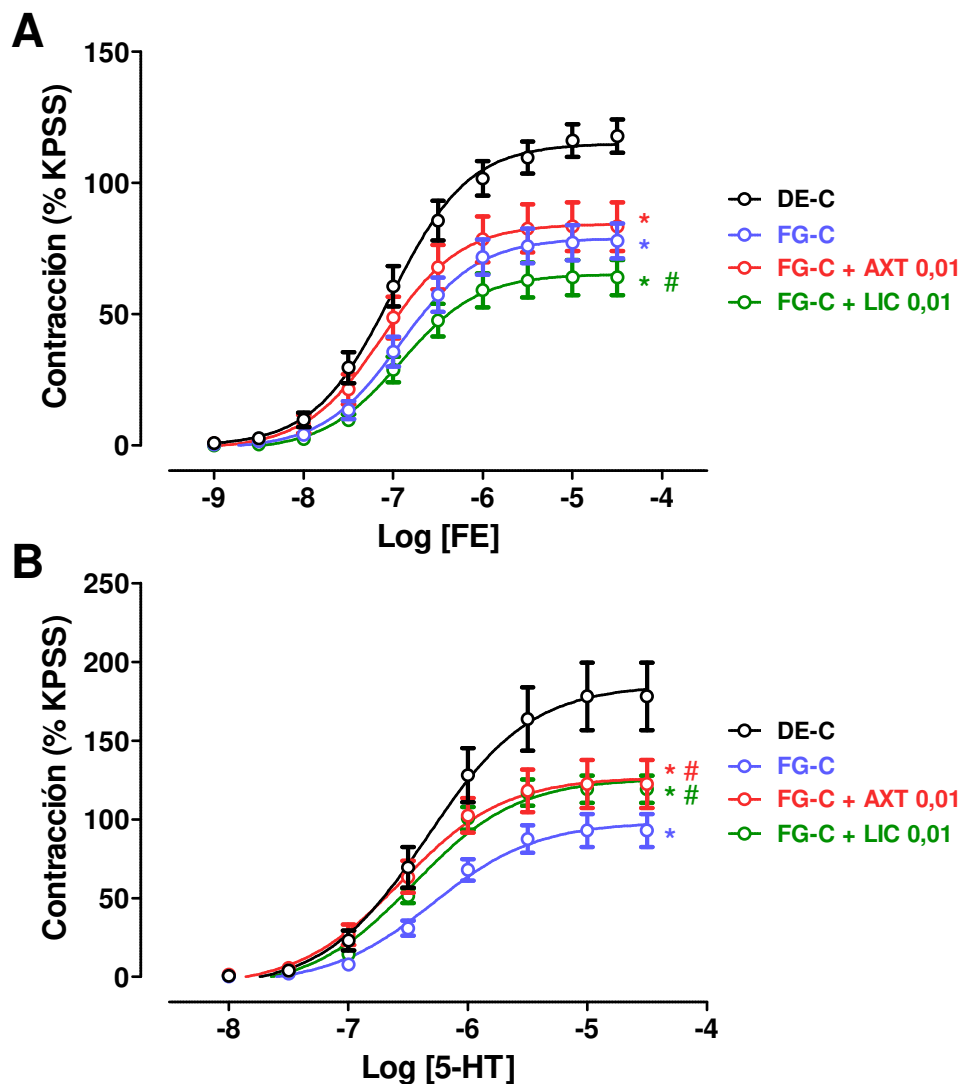


**Figura 38.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-6}$  M) en anillos de arteria aorta, precontraídos con fenilefrina, de ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C. # $p < 0,05$  frente al grupo FG-C.

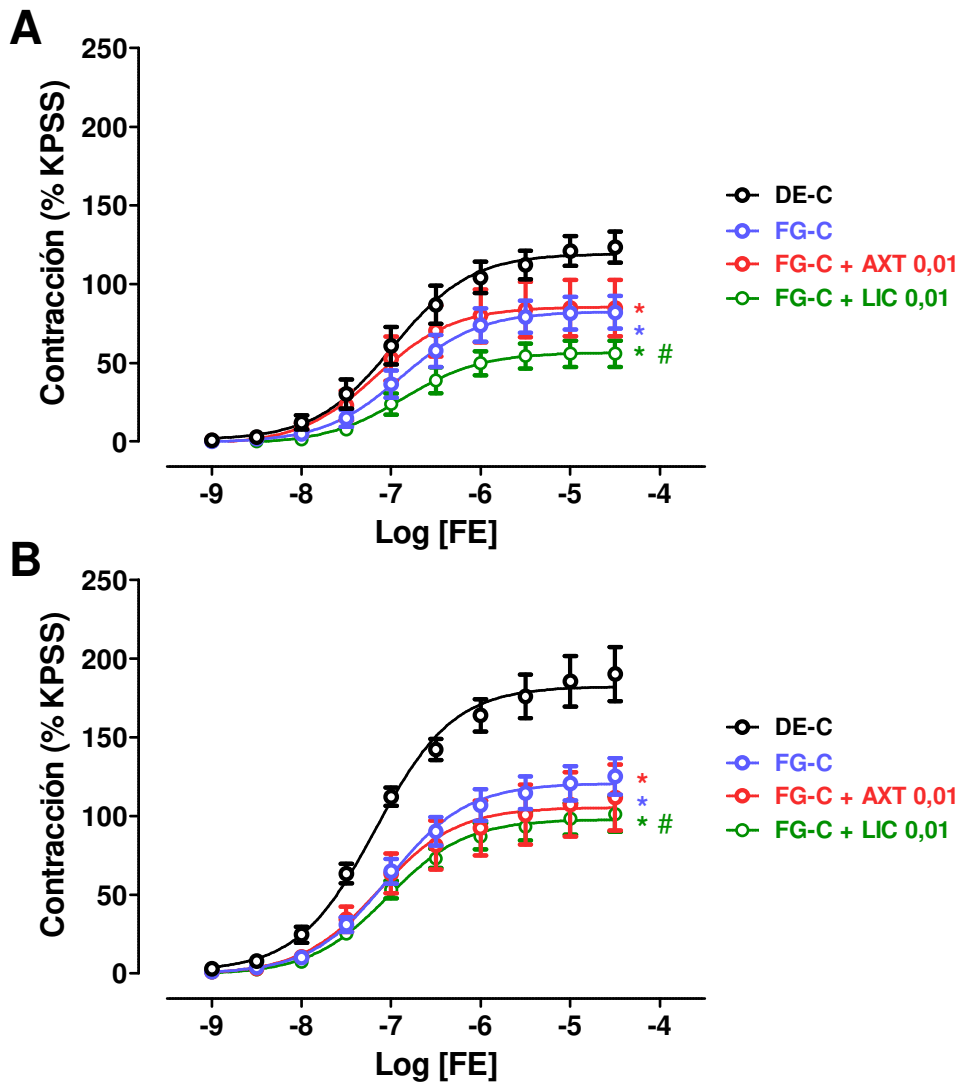
**Tabla 18.** Valores de relajación máxima ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$  de las curvas de contracción-respuesta a acetilcolina (ACh) en anillos de arteria aorta.

	ACh	
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
DE-C	$74,9 \pm 2,7$	$7,3 \pm 0,1$
FG-C	$74,0 \pm 3,1$	$7,1 \pm 0,1^*$
FG-C + AXT 0,01	$88,3 \pm 2,7^{* \#}$	$7,2 \pm 0,1$
FG-C + LIC 0,01	$75,1 \pm 3,3$	$7,3 \pm 0,1^{\#}$

Ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C. # $p < 0,05$  frente al grupo FG-C.



**Figura 39.** Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (FE  $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) **[A]** y serotonina (5-HT  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) **[B]** en anillos de arteria aorta de ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C. # $p < 0,05$  frente al grupo FG-C.



**Figura 40.** Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (FE  $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en ausencia **[A]** y en presencia de L-NAME ( $10^{-4}$  M) **[B]** en anillos de arteria aorta de ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C. # $p < 0,05$  frente al grupo FG-C.



**Tabla 19.** Valores de contracción máxima ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$  de las curvas de contracción a fenilefrina (FE) y serotonina (5-HT) y valores de contracción a solución hiperpotásica (KPSS, 120 mM) en anillos de arteria aorta.

	FE		5-HT		KPSS
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	mN
<b>DE-C</b>	117,9 ± 6,4	7,0 ± 0,1	178,2 ± 21,5	6,3 ± 0,1	2,8 ± 0,2
<b>FG-C</b>	78,0 ± 6,7*	6,9 ± 0,1	93,0 ± 10,5*	6,3 ± 0,1	2,9 ± 0,2
<b>FG-C + AXT 0,01</b>	83,4 ± 9,2*	7,1 ± 0,1	122,4 ± 15,3*	6,6 ± 0,1	3,1 ± 0,2
<b>FG-C + LIC 0,01</b>	64,0 ± 6,7*	6,9 ± 0,1	119,1 ± 8,6*	6,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2

Ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.

**Tabla 20.** Valores de contracción máxima ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$  de las curvas de contracción a fenilefrina (FE) en ausencia y presencia de L-NAME ( $10^{-4}$  M) en anillos de arteria aorta.

	FE		FE (incubación L-NAME)	
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
<b>DE-C</b>	123,4 ± 9,9	7,0 ± 0,1	190,1 ± 17,3	7,2 ± 0,1
<b>FG-C</b>	82,1 ± 10,4*	6,9 ± 0,2	125,2 ± 11,6*	7,0 ± 0,1
<b>FG-C + AXT 0,01</b>	84,8 ± 17,8*	7,2 ± 0,3	111,7 ± 21,0*	7,1 ± 0,2
<b>FG-C + LIC 0,01</b>	55,8 ± 8,2*	6,9 ± 0,2	101,1 ± 11,3*	7,0 ± 0,1

Ratones C57BL/6J alimentados con dietas comerciales: estándar (DE-C) y enriquecida en fructosa y grasa sola (FG-C) o suplementada con astaxantina 0,01% (FG-C + AXT 0,01) o licopeno 0,01% (FG-C + LIC 0,01). \* $p < 0,05$  frente al grupo DE-C.



**VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**  
**– METODOLOGÍA**

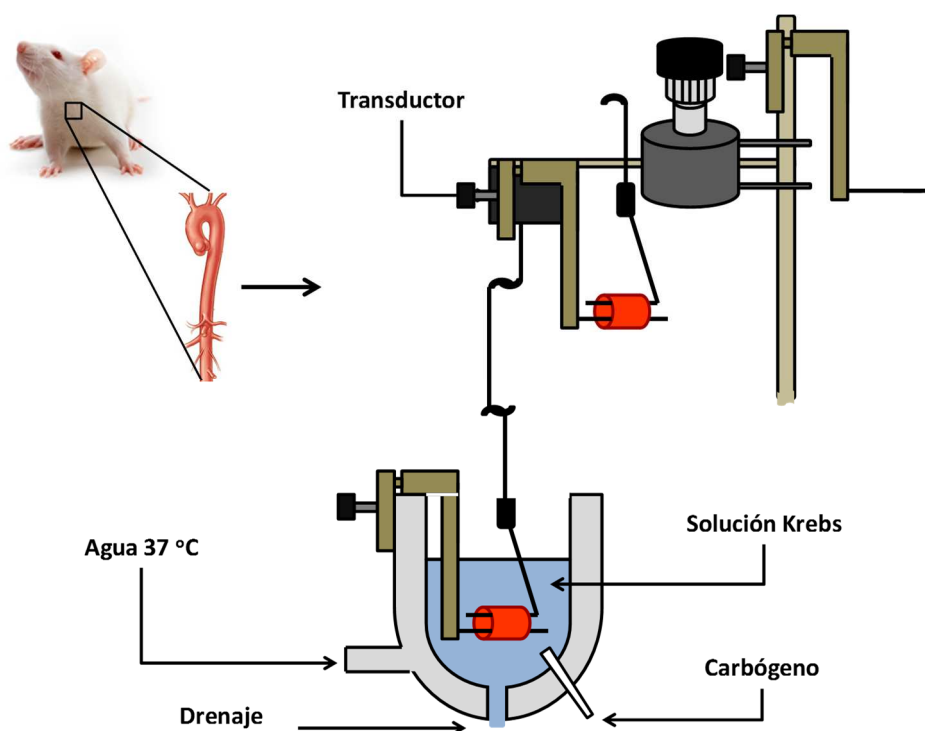


## 1. Modelos de disfunción endotelial en arteria aorta

Muchos antioxidantes resultan útiles en el tratamiento y la prevención de enfermedades en las que está implicado el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una de las principales causas de disfunción endotelial, una alteración de la capacidad reguladora del endotelio que conduce al desarrollo y progresión de las ECV. Por eso, nos planteamos investigar el efecto de la astaxantina y del licopeno en distintos modelos de disfunción endotelial *in vitro*.

Para estos estudios de funcionalidad vascular se emplearon ratas Wistar macho de 300-350 g. Tras el sacrificio, se extrae la arteria aorta, se limpia del tejido conectivo y graso que la rodea y se corta en anillos de 3 mm. A través de la luz de cada anillo se introducen dos alambres finos de acero inoxidable y se coloca en baños de órgano aislado con solución Krebs a 37 °C. Estos baños poseen una doble pared de vidrio por la que circula agua a 37 °C impulsada por una bomba termostática (TECTRON 4373200, Selecta, España). La parte inferior del baño tiene un orificio por el que llega de forma controlada carbógeno. Uno de los alambres se fija al baño de órganos y el otro se conecta a un transductor isométrico (modelo UF-1, Harvard Apparatus, Inc., EEUU) (figura 41). Los cambios de tensión se registran mediante un programa informático para Windows, PowerLab/800 (AD Instruments, Reino Unido).

Tras el montaje, los anillos se someten a una tensión de 2 g y se dejan estabilizar durante 60 minutos renovando la solución nutritiva a los 30 minutos y reajustando la tensión si fuera necesario. Transcurrido el período de estabilización se comprueba la funcionalidad del tejido añadiendo al baño FE ( $10^{-7}$  M) y una vez que se alcanza una meseta de contracción estable se realiza una curva concentración-respuesta a ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M). A continuación, se lavan los anillos repetidamente y tras 30 minutos se renueva la solución nutritiva, se reajusta la tensión si es necesario y se deja estabilizar la preparación durante otros 30 minutos. A partir de este momento, se procede a la realización de los diferentes protocolos encaminados a evaluar si la astaxantina y el licopeno pueden mejorar la disfunción endotelial inducida por la generación de radicales libres. Puesto que los compuestos se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO), los experimentos control se realizan en presencia de este vehículo. Para estos ensayos, la astaxantina fue suministrada por Sigma-Aldrich (España) y el licopeno por BOC Sciences (EEUU).

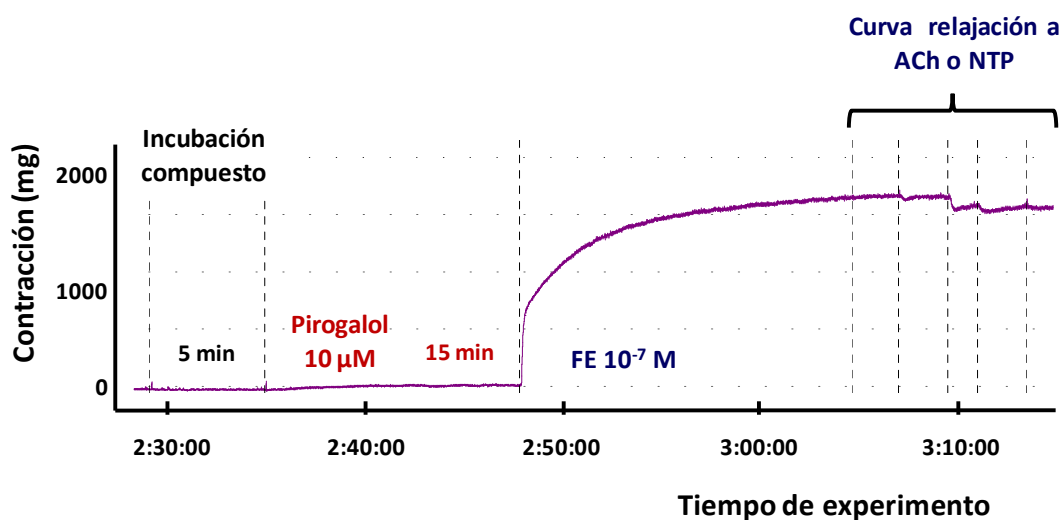


**Figura 41.** Baño de órganos y transductor isométrico para el montaje de anillos de arteria aorta de rata.

### 1.1 Disfunción endotelial inducida por pirogalol

El pirogalol es un compuesto que se autooxida de forma espontánea formando radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  en el medio extracelular. Los efectos negativos de estos radicales sobre la reactividad vascular se pueden valorar *in vitro* estudiando las modificaciones en la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora de diversos agonistas<sup>184</sup>. Se estudia la respuesta a la ACh y al NTP después de la incubación con pirogalol. En estudios previos, hemos seleccionado  $10\ \mu\text{M}$  como concentración óptima de pirogalol, pues provoca un deterioro de la función endotelial tras 15 minutos de incubación. Los compuestos objeto de estudio se incorporan al baño 5 minutos antes que el pirogalol y transcurrido el tiempo de incubación, los anillos se contraen con FE  $10^{-7}\ \text{M}$  y se realiza la curva de relajación con ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-4}\ \text{M}$ ) o NTP ( $10^{-9}$ - $10^{-4}\ \text{M}$ ) (figura 42). Además de los carotenoides astaxantina ( $1$  y  $10\ \mu\text{M}$ ) y

licopeno (10  $\mu\text{M}$ ), valoramos como compuestos de referencia la SOD (100 UI/mL) y la quercetina (10  $\mu\text{M}$ ).

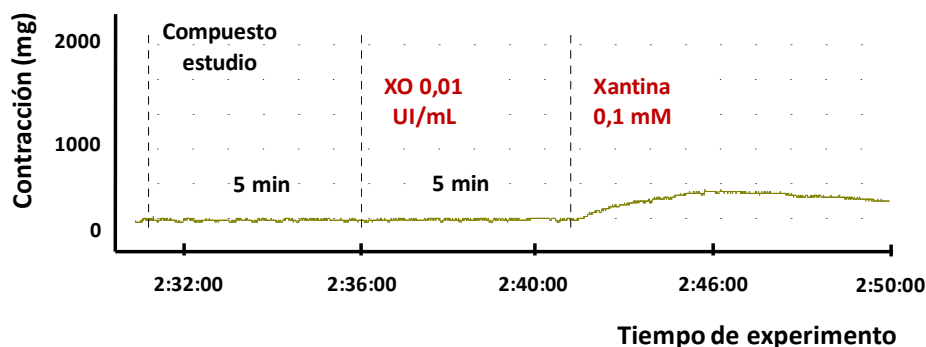


**Figura 42.** Registro original del protocolo de disfunción endotelial inducida por el pirogalol en anillos de arteria aorta de rata.

## 1.2 Disfunción endotelial inducida por el sistema xantina/xantina oxidasa

La XO es una forma de xantina oxidoreductasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y posteriormente a ácido úrico. En condiciones normales, la enzima se encuentra en su forma deshidrogenasa, pero bajo determinadas circunstancias, como hipoxia, debido a la proteólisis u oxidación de los grupos sulfhidrilos de la enzima, predomina la forma oxidada que genera  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>109</sup>.

Se estudia el efecto sobre la contracción que generan los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  producidos en la reacción enzimática catalizada por la XO. Para ello, se incuba el compuesto en estudio o el vehículo durante 5 minutos, se añade la enzima XO (0,01 UI/mL) y pasados otros 5 minutos, se añade xantina (0,1 mM) (figura 43) y se cuantifica la respuesta en ausencia y en presencia de distintos compuestos: alopurinol (10  $\mu\text{M}$ ), SOD (200 UI/mL), astaxantina (10  $\mu\text{M}$ ), licopeno (10  $\mu\text{M}$ ) y quercetina (10  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 43.** Registro original del protocolo de disfunción endotelial inducida por el sistema xantina/xantina oxidasa en anillos de arteria aorta de rata.

### 1.3 Disfunción endotelial inducida por homocisteína

La hiperhomocisteinemia se considera como un factor de riesgo cardiovascular independiente. La homocisteína es un aminoácido azufrado que se origina en el metabolismo de la metionina (figura 44). Su síntesis se realiza a través de la condensación de la metionina con ATP que da lugar a una molécula donadora de grupos metilo, la S-adenosilmetionina. Esta dona su grupo metilo a un aceptor y origina la S-adenosilhomocisteína, que por la adenosilhomocisteinasa genera homocisteína y adenosina. La homocisteína es una molécula muy agresiva para el endotelio vascular. Su eliminación, evitando así el aumento de sus concentraciones plasmáticas, se realiza de forma eficiente a través de dos rutas metabólicas principales: la transulfuración y la remetilación. Cabe destacar la importancia de las vitaminas B6 y B12 en el metabolismo de la homocisteína<sup>185</sup>.

Se han propuesto diferentes mecanismos por los que homocisteína causa disfunción endotelial: autooxidación, activación y aumento de la expresión de NADPH oxidasas, interferencia en la ruta del NO (desacoplamiento de la NOSe, inhibición del transporte de L-arginina y de la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa), estrés del retículo endoplásmico y efecto proinflamatorio y protrombótico<sup>186</sup>. Se trata de un modelo de disfunción endotelial más complejo que los anteriores, pues participan diferentes mecanismos.



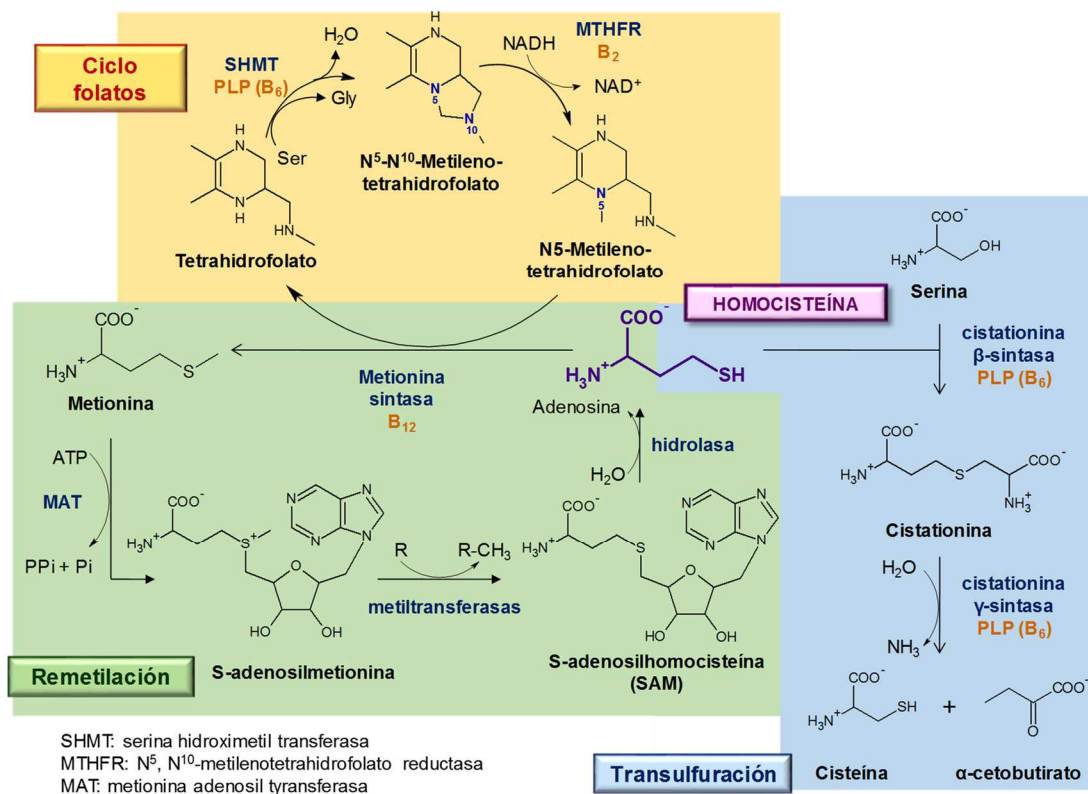
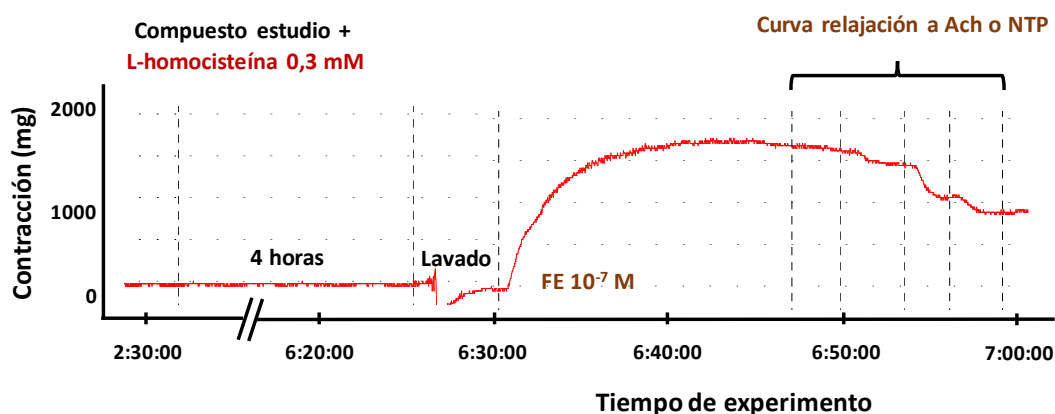


Figura 44. Metabolismo de la homocisteína.

El protocolo experimental consiste en añadir al baño los compuestos objeto de estudio y la L-homocisteína (0,3 mM) y se incuban durante 4 horas. Trascorrido ese tiempo, se vacía el baño y se renueva la solución nutritiva. De esta forma, se eliminan los compuestos y la L-homocisteína del medio y se ponen de manifiesto los daños ocasionados durante la incubación. A continuación, los anillos se contraen con FE (10<sup>-7</sup> M) y se realiza la curva concentración-respuesta a la ACh (10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup> M) o al NTP (10<sup>-11</sup>-3x10<sup>-7</sup> M), según proceda (figura 45). Algunos ensayos se llevan a cabo en anillos a los que se retira el endotelio mediante fricción con una aguja rugosa. También se realizan curvas concentración-respuesta a FE (10<sup>-9</sup>-3x10<sup>-5</sup> M) para valorar el efecto de homocisteína sobre la respuesta contracturante.

Para comprobar la viabilidad del tejido después de la incubación se realizan ensayos control empleando el mismo protocolo en ausencia de homocisteína. Los compuestos objeto de estudio se añaden al baño junto con la L-homocisteína.

Además de evaluar el efecto de la astaxantina (100, 10, 1 y 0,1  $\mu\text{M}$ ) y del licopeno (10, 1 y 0,1  $\mu\text{M}$ ) sobre la disfunción endotelial producida por homocisteína, se profundiza en el mecanismo de alteración endotelial provocado por la propia homocisteína. Por ello, se evalúa el efecto sobre la respuesta a ACh en presencia de los siguientes compuestos: tirón (1 mM), compuesto con capacidad captadora de radicales  $\cdot\text{O}_2$ ; difenil iodonium (DPI, 10  $\mu\text{M}$ ) y apocinina (100  $\mu\text{M}$ ), inhibidores de NADPH oxidasas; L-Arginina (1 mM), sustrato de la NOS; alopurinol (100  $\mu\text{M}$ ), inhibidor de la XO; y quercetina (10  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 45.** Registro original del protocolo de disfunción endotelial inducida por homocisteína en anillos de arteria aorta de rata.

#### 1.4 Expresión y análisis de los resultados

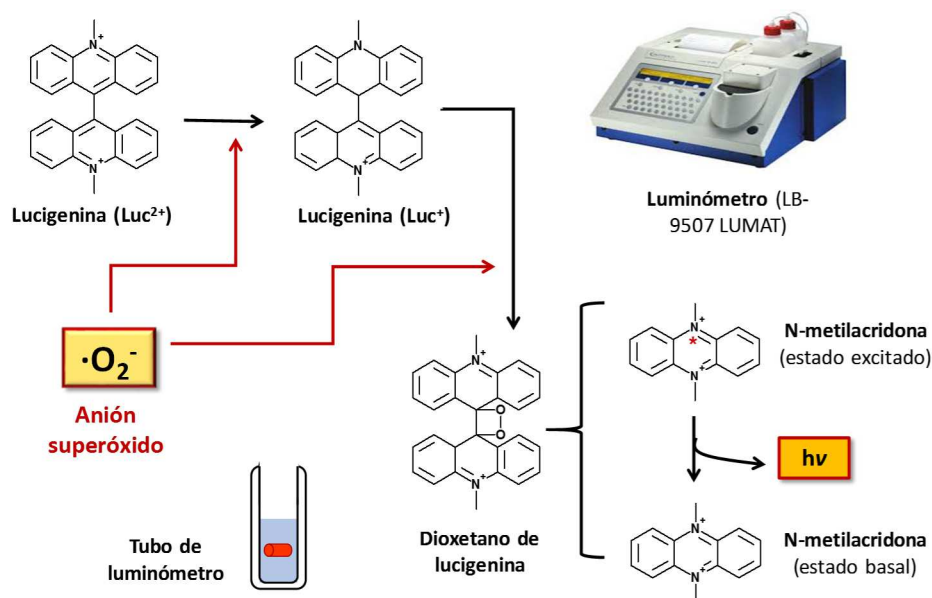
El efecto de la ACh y el NTP se expresa como % de relajación respecto a la respuesta contráctil obtenida con FE. La respuesta a la FE y a la xantina se expresa en mg en las curvas de contracción.

En todas las curvas concentración-respuesta se obtienen los valores de  $E_{\text{max}}$  y  $pD_2$ . Este último parámetro se obtiene mediante el ajuste de las curvas a un modelo logístico no lineal, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad software Inc, EEUU).

## 2. Evaluación de la capacidad antioxidante

### 2.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante quimioluminiscencia

Los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  se pueden cuantificar mediante quimioluminiscencia con lucigenina. Este método se basa en la reducción inicial de un electrón de la lucigenina dicatiónica ( $\text{Luc}^{2+}$ ) formando un radical monocatiónico ( $\text{Luc}^+$ ). Este radical reacciona con  $\text{O}_2^-$  dando lugar a dioxetano ( $\text{LCO}_2$ ), un compuesto inestable que se descompone espontáneamente en N-metilacridona electrónicamente excitada. Cuando esta vuelve al estado de equilibrio se acompaña de la emisión de luz, la cual se detecta con un fotodetector en un luminómetro (LB-9507 LUMAT, Berthold Technologies, Alemania), de acuerdo a las siguientes reacciones (figura 46):



**Figura 46.** Reacción de lucigenina ( $\text{Luc}^{2+}$ ) con el radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ).

Tomando como base los tres modelos de disfunción endotelial empleados en los estudios de reactividad vascular en arteria aorta descritos anteriormente, se evalúa el efecto de distintos compuestos sobre la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ .

#### **·O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por el pirogalol**

El compuesto a ensayar se incuba, durante 20 minutos, en un tubo para luminómetro con solución Krebs a 37 °C y pirogalol (10 µM). A continuación, se añade lucigenina (5 µM) y se mide la luminiscencia a intervalos de 10 segundos durante 5 minutos.

*Los resultados se expresan como unidades relativas de luminiscencia por minuto (URL/min).*

#### **·O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por el sistema xantina/xantina oxidasa**

Se mide el efecto del licopeno y de la astaxantina sobre la producción de radicales ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> generados por la estimulación de la enzima XO. En un tubo para luminómetro con solución Krebs a 37 °C se añade XO (0,01 U/mL) y el compuesto objeto de estudio. Esta mezcla se incuba durante 5 minutos y a continuación se incorpora xantina (100 µM) y lucigenina (5 µM). Por último, se mide la luminiscencia como hemos indicado en el apartado anterior.

*Los resultados se expresan como URL/min.*

#### **·O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por NADPH-oxidasa**

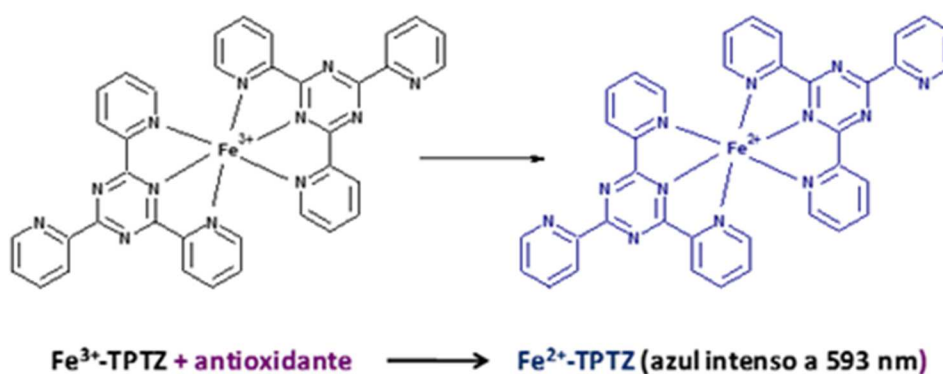
Las determinaciones se realizan empleando los mismos anillos de arteria aorta utilizados en los estudios de reactividad vascular con homocisteína. Los anillos se incuban durante 15 minutos en un tubo para luminómetro con solución ROS (anexo 1) a 37 °C y oxigenación continua. Posteriormente, se añade lucigenina (5 µM) y NADPH (10<sup>-4</sup> M) para estimular la producción de radicales ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> y se lee la luminiscencia como se ha indicado anteriormente.

*Los resultados se expresan en URL/min respecto al peso de los anillos (URL/min/mg).*

## **2.2 Determinación directa de la capacidad antioxidante: ensayos DPPH y FRAP**

Un compuesto puede reaccionar directamente con los radicales libres deteniendo el proceso de oxidación. Este efecto lo puede llevar a cabo con reacciones

de transferencia de un átomo de hidrógeno o de un electrón. El método FRAP (del inglés, *Ferric Reducing Antioxidant Power*) se incluye dentro de los segundos; el ensayo mide la capacidad que poseen los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a través de una reacción colorimétrica. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) se reduce a  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ por el agente reductor, dando lugar a un complejo azul intenso que puede medirse por espectrofotometría<sup>187</sup>:

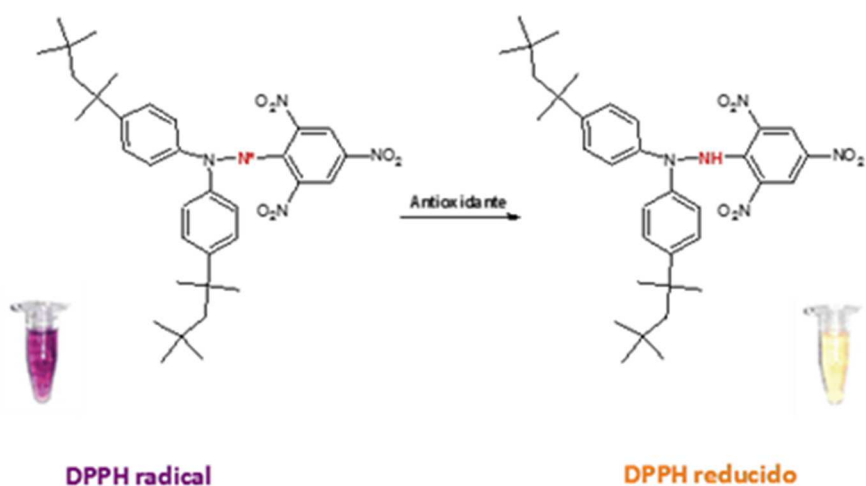


El reactivo FRAP está compuesto por TPTZ (10 mM) disuelto en HCl (40 mM), tricloruro de hierro (20 mM) y tampón acetato (300 mM, pH 3,6), en proporción 1:1:10 (v/v/v). Las muestras de astaxantina y licopeno se preparan en DMSO en diferentes concentraciones (0,06-6 mg/mL). Para la reacción se mezclan 200  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP con 16  $\mu\text{L}$  de muestra o del vehículo (DMSO). Tras 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 593 nm, usando el reactivo FRAP con DMSO como blanco. El análisis se hace por triplicado.

*Los resultados se obtienen extrapolando la absorbancia de las muestras en una recta de calibrado preparada con Trolox (análogo de la vitamina E) 30-1.000  $\mu\text{M}$  en DMSO y se expresan en  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox (ET) por g de carotenoide.*

El otro método utilizado se basa en la capacidad de captación del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), radical estable de color violeta, que en presencia de sustancias captadoras de radicales libres se reduce, con la consiguiente pérdida de color<sup>188</sup>:

## Metodología



Para el ensayo, se mezcla una solución de DPPH (250 mM) con diferentes concentraciones de astaxantina o licopeno disueltos en DMSO. Las muestras se incuban durante 30 minutos en la oscuridad y se mide la absorbancia a 517 nm. El DMSO se utiliza como control.

*Los resultados se expresan como % de inhibición, según la ecuación:*

$$\% \text{ de inhibición} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

*donde  $A_0$  es la absorbancia del control y  $A_1$  la absorbancia del compuesto después de incubar con los compuestos objeto de estudio.*

# **VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE - RESULTADOS**





## 1. Disfunción endotelial inducida por pirogalol

La incubación con pirogalol disminuyó de forma drástica la relajación a ACh, observándose valores de respuesta máxima a este agente inferiores al 20%, y desplazó la curva del NTP a la derecha sin modificar el Emax, lo que indica una reducción de la sensibilidad del tejido a este compuesto. Esta pérdida de sensibilidad se mantuvo en ausencia de endotelio. La incubación con SOD (100 UI/mL) revirtió ambas alteraciones (figura 47 y tabla 21), lo que indica la participación de los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  en el efecto del pirogalol. El flavonol quercetina, usado como control positivo, evitó parcialmente el efecto pernicioso del pirogalol sobre la relajación a la ACh, mejorando también la sensibilidad al NTP (figura 47). Sin embargo, la astaxantina y el licopeno resultaron ineficaces en la prevención del daño endotelial provocado por el pirogalol (figura 48). La presencia de pirogalol también produce un incremento de la respuesta contracturante a FE que ninguna de las sustancias ensayadas logró revertir (figura 49-A).

En la figura 49-B se representan los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  producidos por la autooxidación del pirogalol. Ni la astaxantina ni el licopeno disminuyeron la señal de quimioluminiscencia, señal que tampoco se vio reducida con la concentración de quercetina utilizada en los ensayos de reactividad vascular. Tan solo la presencia de SOD fue capaz de reducir los niveles de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ .

## 2. Disfunción endotelial inducida por el sistema xantina/xantina oxidasa

La estimulación de la enzima XO genera radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  que dan lugar a una respuesta contracturante en anillos de arteria aorta. En estas condiciones, el alopurinol y la SOD fueron efectivos para inhibir la contracción mientras que ni la quercetina ni los carotenoides consiguieron reducir la respuesta (figura 50 y tabla 22).

Los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  producidos por el sistema xantina/XO también se midieron por quimioluminiscencia y, de nuevo, el alopurinol y la SOD anularon casi por completo la señal. En cuanto a los carotenoides objeto de estudio, el licopeno mostró una reducción concentración-dependiente de la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  y la astaxantina solo fue capaz de reducir la señal de luminiscencia de forma significativa con la concentración más alta ensayada (50  $\mu\text{M}$ ). Por su parte, la quercetina mostró

también capacidad para reducir la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  de manera concentración-dependiente y con mayor potencia que los carotenoides (figura 51).

### 3. Disfunción endotelial inducida por homocisteína

La incubación con homocisteína (300  $\mu\text{M}$ ) durante 4 horas produjo una pérdida significativa de la respuesta relajante a ACh en anillos de arteria aorta de ratas Wistar (figura 52-A) y no influyó en la relajación independiente de endotelio. Las curvas concentración-respuesta al NTP se solapan con las de los anillos no incubados con homocisteína tanto en presencia como en ausencia de endotelio (figura 53). Sin embargo, se vieron diferencias en la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica (figura 52-B), pues la contracción con FE fue ligeramente superior con homocisteína (Control,  $1.736 \pm 177$  mg y Homocisteína,  $1.925 \pm 133$  mg,  $p < 0,05$ ). La incubación simultánea de homocisteína y tirón, compuesto con capacidad captadora de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ , revirtió la pérdida de relajación (figura 54-A). La incubación simultánea con apocinina no modificó el efecto de la homocisteína y con DPI se anuló casi por completo la relajación (figura 54-B). Cabe señalar que cuando los anillos se incubaron solamente con DPI se obtuvo una pérdida de relajación a ACh mayor a la obtenida con homocisteína, pero menor a la resultante de la co-incubación. Por otra parte, la pérdida de relajación ocasionada por homocisteína se revirtió parcialmente en presencia de L-arginina o alopurinol. (figura 55-A).

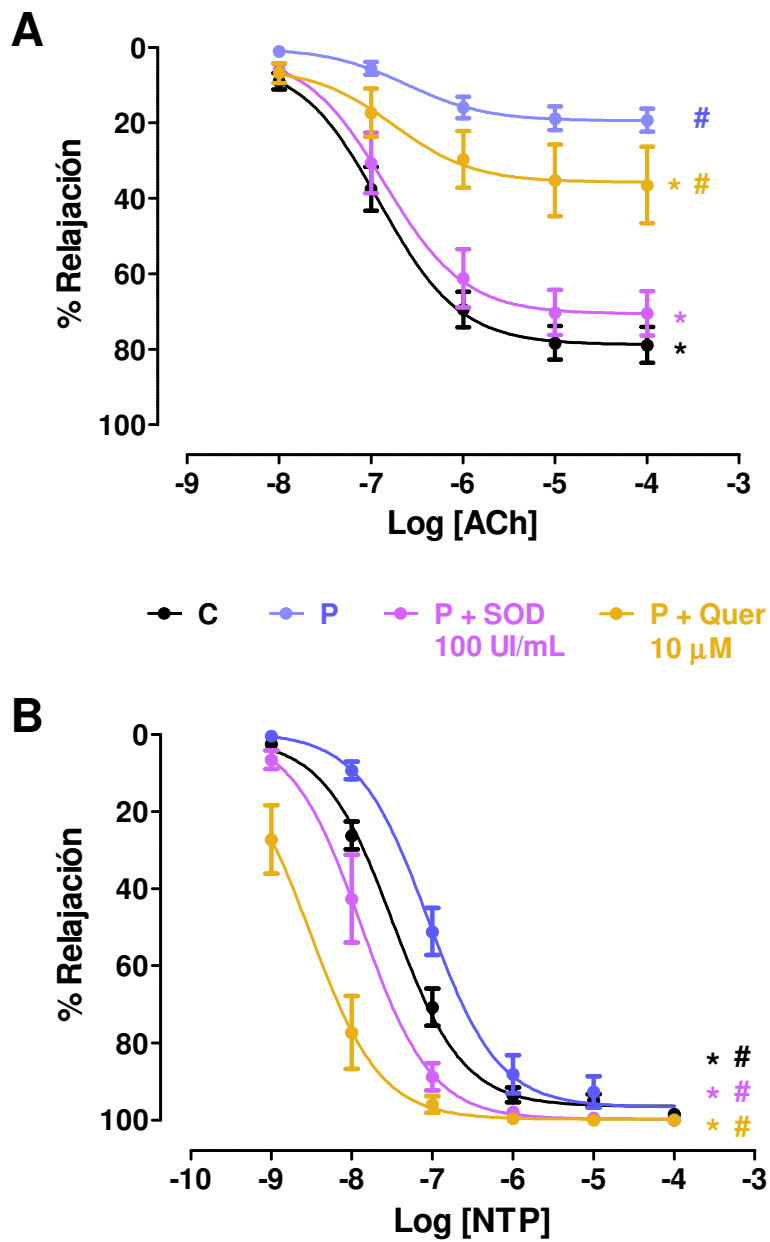
La incubación simultánea con quercetina evitó la pérdida de relajación (figura 55-B), efecto que no se observó tras la incubación con astaxantina o licopeno a la dosis de 10  $\mu\text{M}$  (figura 56). Sorprendentemente, dosis superiores de astaxantina empeoraron la respuesta. Por eso, se ensayaron dosis inferiores de ambos carotenoides (1  $\mu\text{M}$ ), obteniendo una leve mejoría de la relajación que no se mantuvo con dosis más bajas (0,1  $\mu\text{M}$ ) (tabla 23).

En los ensayos de quimioluminiscencia se observó una reducción de la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  estimulada con NADPH en los anillos que habían estado en presencia de homocisteína durante 4 horas, tanto si las muestras procedían de anillos con o sin endotelio (figura 58). Al igual que en los ensayos de reactividad vascular, el efecto de la homocisteína se revirtió en los anillos incubados con tirón y quercetina y se hizo más patente en presencia del DPI y la concentración más alta de astaxantina. Los anillos procedentes de la incubación con distintas concentraciones de licopeno, dosis menores de astaxantina, apocinina, L-arginina y alopurinol no

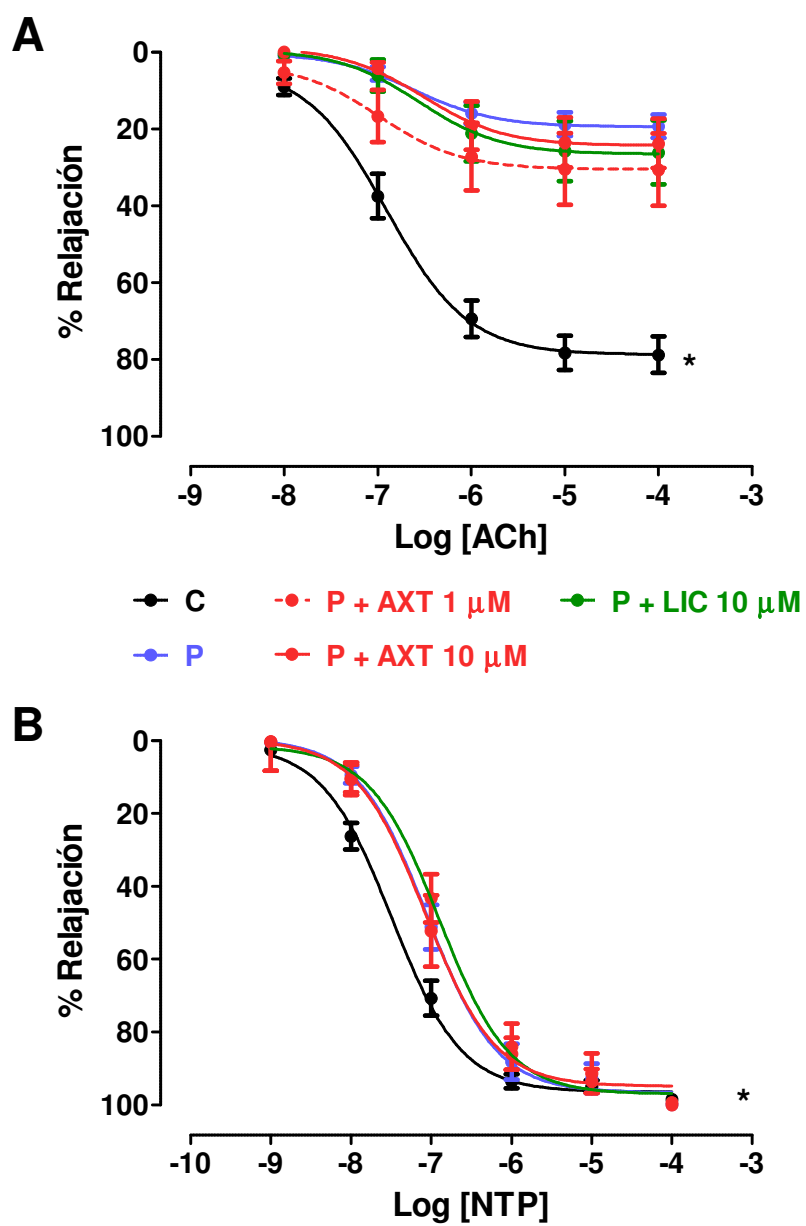
modificaron la señal respecto a los anillos incubados solo con homocisteína (figura 57 y tabla 23).

#### **4. Métodos directos de determinación de la capacidad antioxidante**

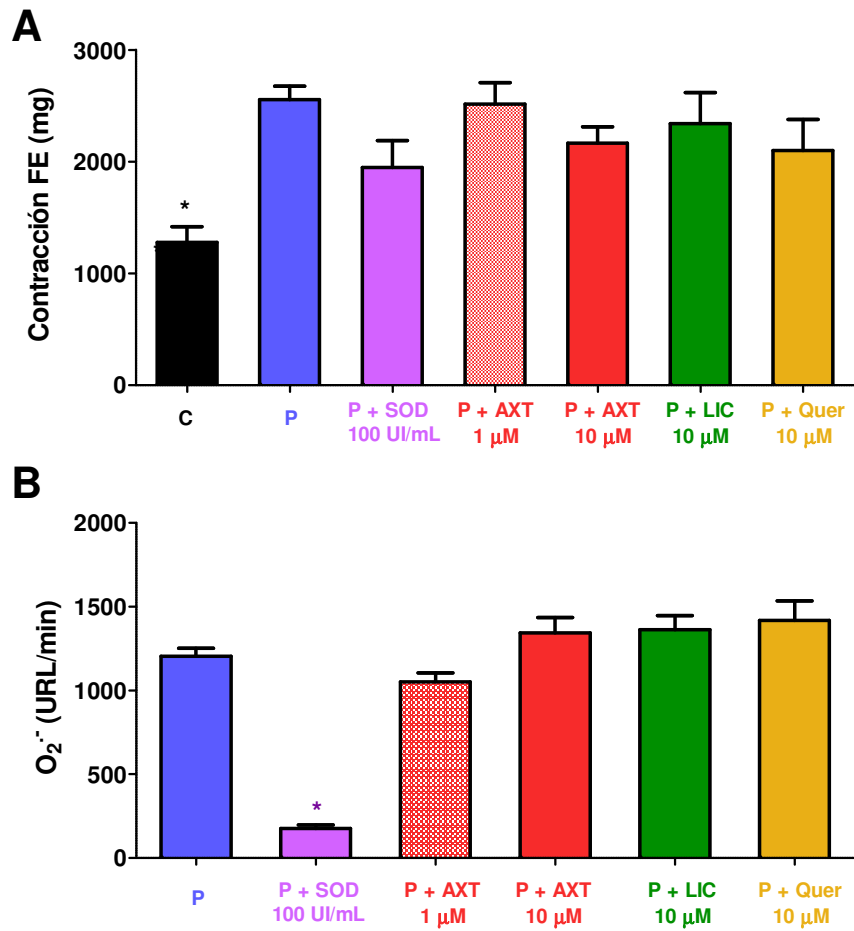
La capacidad antioxidante de la astaxantina y del licopeno se evaluó mediante los ensayos DPPH y FRAP. La señal colorimétrica obtenida con DPPH (250 mM) no se inhibió ni con la astaxantina ni con el licopeno. El flavonol quercetina, utilizado como control positivo, sí fue capaz de disminuir la señal de absorbancia de forma concentración-dependiente (figura 59). Los valores de capacidad antioxidante obtenidos con el ensayo FRAP fueron de  $20 \pm 2$   $\mu\text{mol ET/g}$  de astaxantina y de  $16 \pm 2$   $\mu\text{mol ET/g}$  de licopeno. Estos valores están muy alejados de los valores superiores a  $100$   $\mu\text{mol ET/g}$  obtenidos con diversas sustancias antioxidantes en otros trabajos<sup>189</sup>.



**Figura 47.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) **[A]** y nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) **[B]** en anillos de arteria aorta de rata en ausencia (C) y en presencia de pirrolol (P) y pirrolol más superóxido dismutasa (P + SOD) o quercetina (P + Quer). \* $p < 0,05$  frente a P y # $p < 0,05$  frente a C.



**Figura 48.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) **[A]** y nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) **[B]** en anillos de arteria aorta de rata en ausencia (C) y en presencia de pirogalol (P) y pirogalol más distintas concentraciones de astaxantina (P + AXT) o licopeno (P + LIC). \* $p < 0,05$  frente a P.



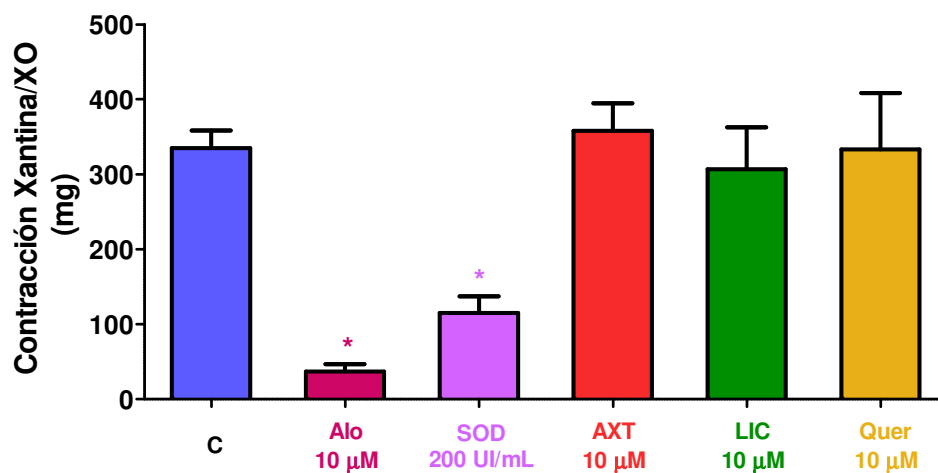
**Figura 49.** Respuesta contracturante de fenilefrina (FE) en anillos de arteria aorta de rata en ausencia (C) y en presencia de pirogalol (P) y pirogalol más superóxido dismutasa (P + SOD), astaxantina (P + AXT), licopeno (P + LIC) o quercetina (P + Quer) **[A]**. Producción de radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) por autooxidación de pirogalol **[B]**. \* $p < 0,05$  frente a P.

		ACh		NTP	
		E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
<b>C</b>	<b>E+</b>	78,8 ± 4,7*	6,9 ± 0,1	98,5 ± 0,4	7,5 ± 0,1*
	<b>E-</b>	-	-	98,5 ± 0,6	7,9 ± 0,0 <sup>#</sup>
<b>P</b>	<b>E+</b>	19,3 ± 3,1	6,6 ± 0,3	100,0 ± 0,2	7,1 ± 0,1
	<b>E-</b>	-	-	99,0 ± 1,0	7,4 ± 0,1
<b>P + SOD</b>		70,5 ± 6,0*	6,9 ± 0,2	100,0 ± 0,0	7,9 ± 0,1*
<b>P + AXT 1 μM</b>		30,6 ± 9,4	7,0 ± 0,7	-	-
<b>P + AXT 10 μM</b>	<b>E+</b>	23,7 ± 6,4	6,5 ± 0,5	100,0 ± 0,0	7,1 ± 0,1
	<b>E-</b>	-	-	100,0 ± 0,0	7,4 ± 0,1
<b>P + LIC 10 μM</b>	<b>E+</b>	26,1 ± 8,4	6,6 ± 0,6	99,3 ± 0,6	6,9 ± 0,1
	<b>E-</b>	-	-	97,9 ± 1,9	7,4 ± 0,1
<b>P + Que 10 μM</b>		36,5 ± 10,1*	6,8 ± 0,6	100,0 ± 0,0	8,5 ± 0,2*

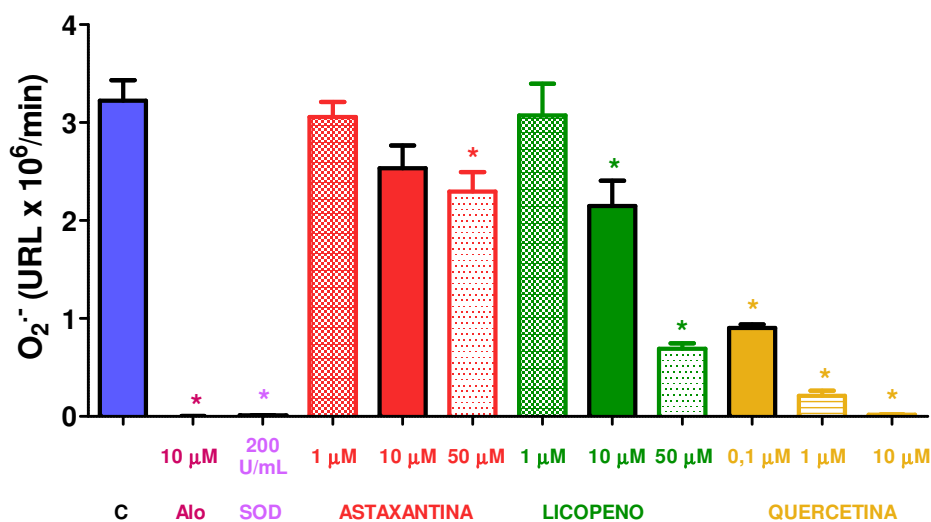
**Tabla 21.** Valores de relajación máxima (E<sub>max</sub>) y pD<sub>2</sub> de las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) y nitroprusiato sódico (NTP) en anillos de arteria aorta de rata en ausencia (C) y en presencia de pirogalol (P) o pirogalol más superóxido dismutasa (P + SOD), distintas concentraciones de astaxantina (P + AXT), licopeno (P + LIC) o quercetina (P + Quer). E+: anillos con endotelio; E-: anillos sin endotelio.

\*p<0,05 frente a P (E+) y # < 0,05 frente a P (E-).

Resultados



**Figura 50.** Respuesta contrácturante producida por la reacción enzimática xantina/xantina oxidasa (XO) en anillos de arteria aorta de rata en ausencia (C) y en presencia de alopurinol (Alo), superóxido dismutasa (SOD), astaxantina (AXT), licopeno (LIC) o quercetina (Quer). \*p<0,05 frente a C.



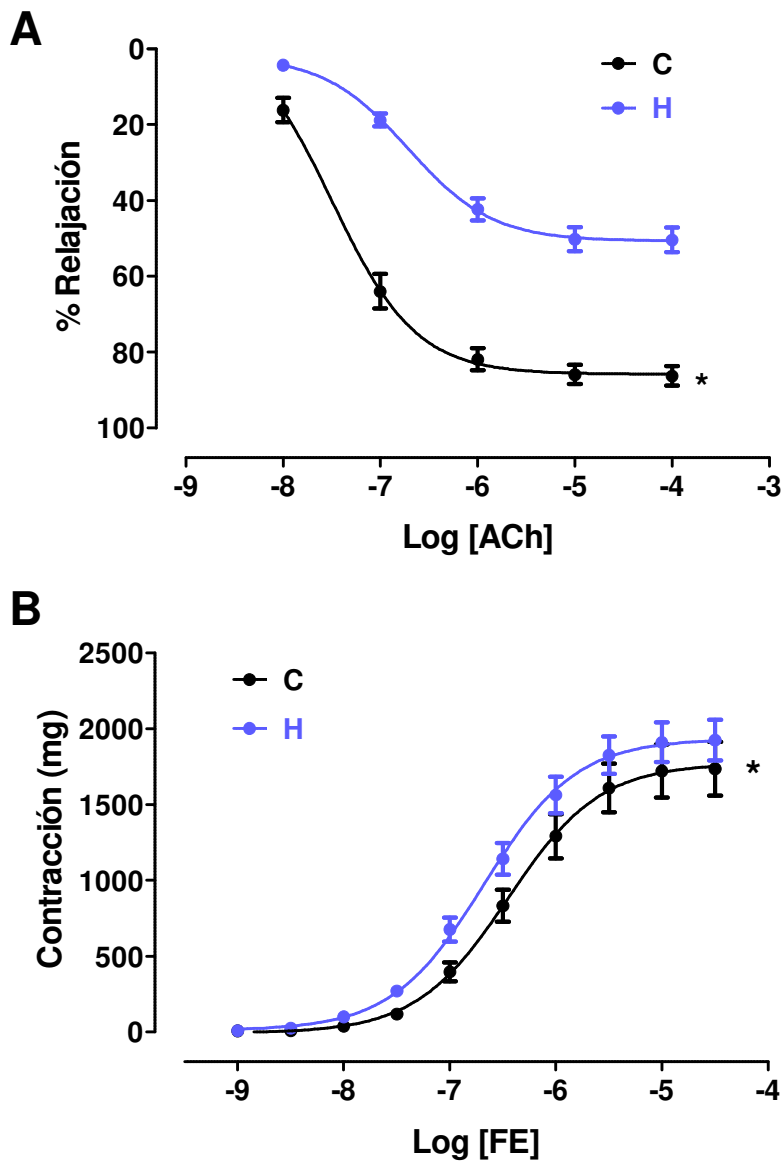
**Figura 51.** Producción de radicales superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) por la reacción enzimática xantina/xantina oxidasa en ausencia (C) y presencia de alopurinol (Alo), superóxido dismutasa (SOD), distintas concentraciones de astaxantina, licopeno o quercetina. \*p<0,05 frente a C.



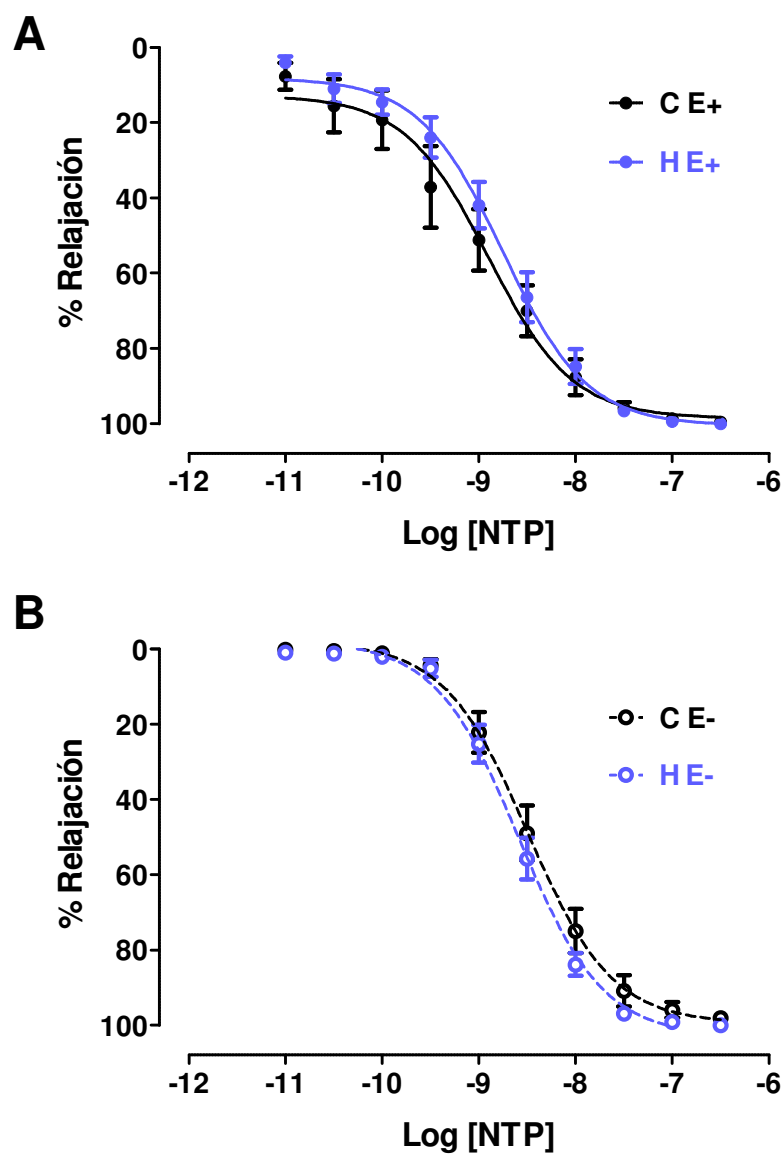
	$\cdot\text{O}_2^-$		Contracción xantina/XO	
		URL/min		mg
<b>C</b>		$3,22 \times 10^6 \pm 209.819$		$335 \pm 23$
<b>Alo</b>		$1.962 \pm 669^*$		$37 \pm 10^*$
<b>SOD</b>		$9.010 \pm 1.870^*$		$115 \pm 23^*$
	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	$3,06 \times 10^6 \pm 153.985$		-
<b>AXT</b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	$2,54 \times 10^6 \pm 229.072$		$358 \pm 37$
	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	$2,30 \times 10^6 \pm 196.990^*$		-
	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	$3,07 \times 10^6 \pm 323.145$		-
<b>LIC</b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	$2,15 \times 10^6 \pm 257.961^*$		$307 \pm 56$
	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	$691.499 \pm 54.812^*$		-
	<b>0,1 <math>\mu\text{M}</math></b>	$901.136 \pm 35.989^*$		-
<b>Quer</b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	$209.774 \pm 49.393^*$		-
	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	$16.290 \pm 1.037^*$		$333 \pm 75$

**Tabla 22.** Producción de radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) por la reacción enzimática xantina/xantina oxidasa (XO) en ausencia de inhibidores (C) y en presencia de alopurinol (Alo), superóxido dismutasa (SOD), distintas concentraciones de astaxantina (AXT), licopeno (LIC) o quercetina (Quer). Respuesta contracturante producida por dicha reacción en anillos de arteria aorta en ausencia (C) y en presencia de Alo, SOD, AXT, LIC o Quer.

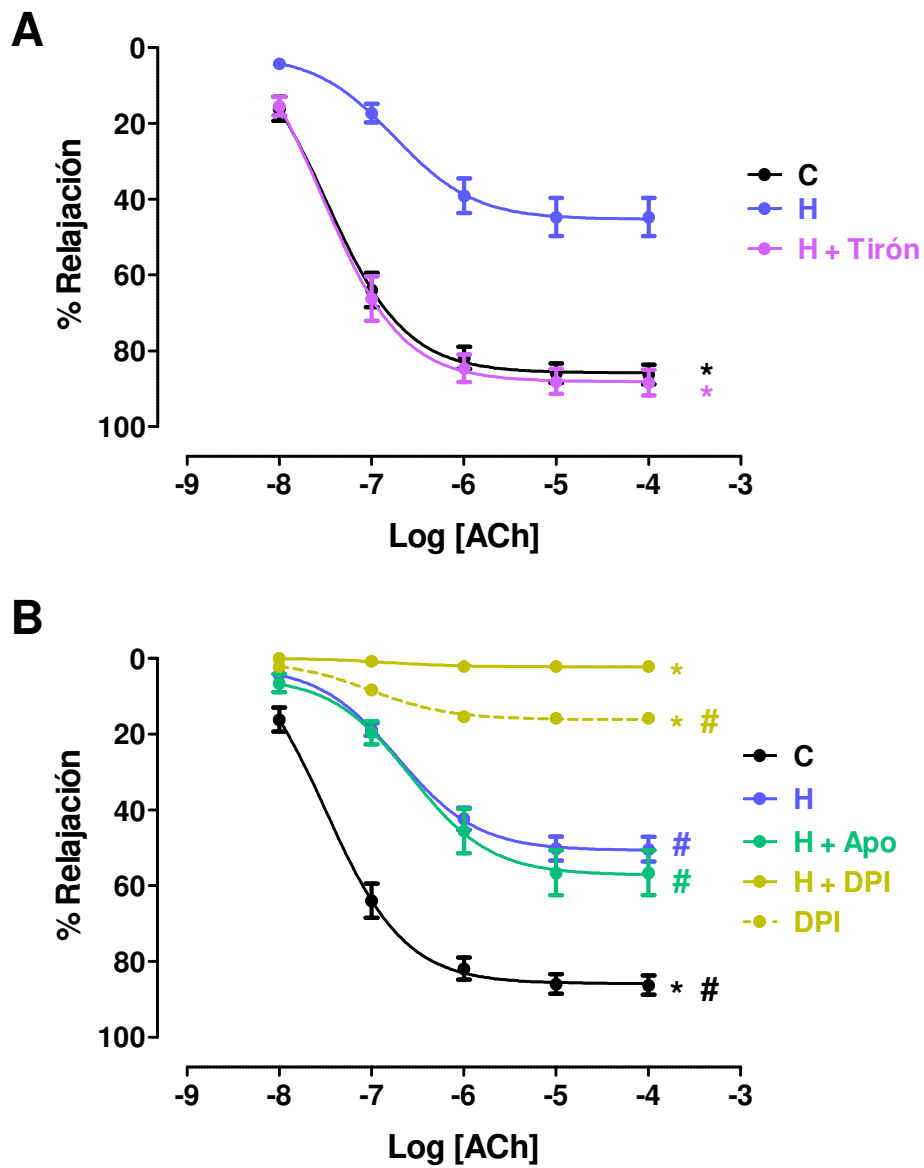
URL, Unidades Relativas de Luminiscencia. \* $p < 0,05$  frente al grupo C.



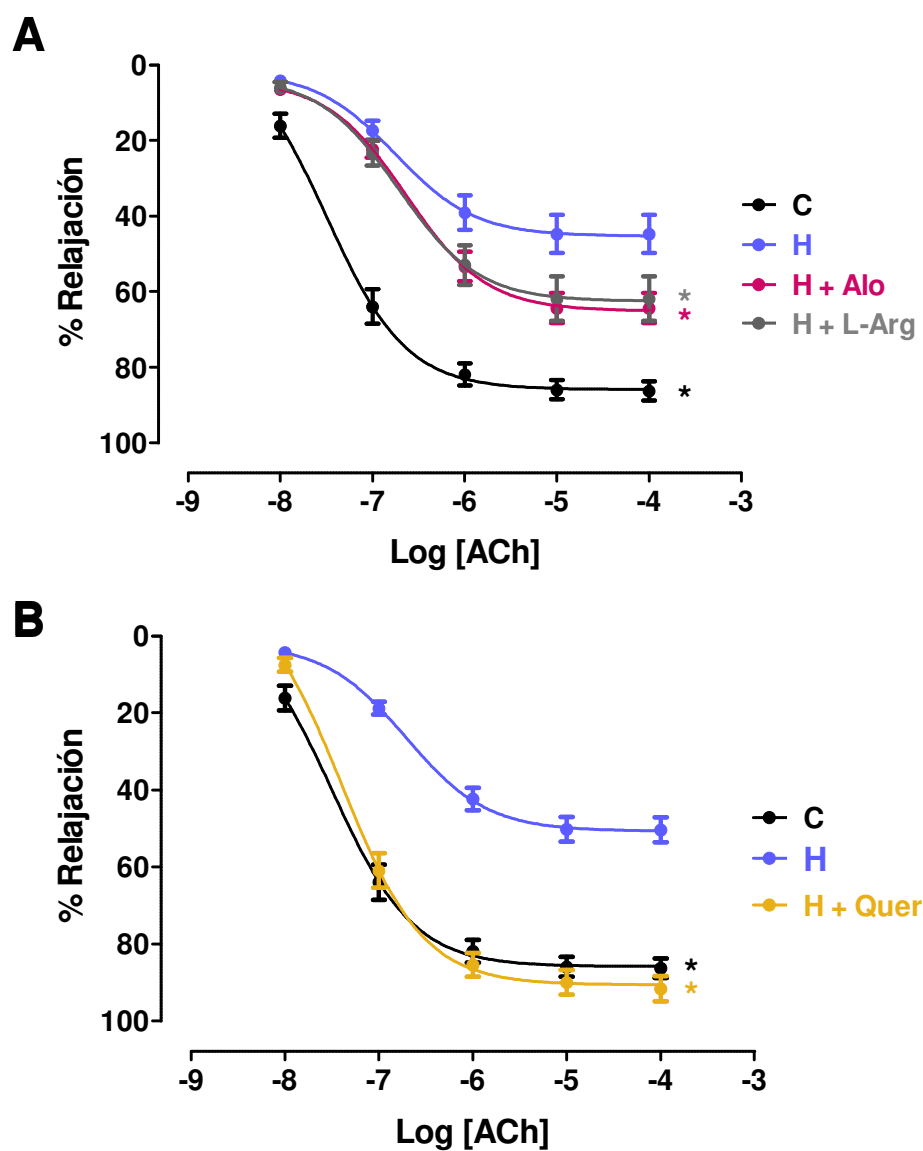
**Figura 52.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) **[A]** y fenilefrina (FE,  $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) **[B]** en anillos de arteria aorta control (C) y pretratados durante 4 horas con homocisteína (H). \* $p < 0,05$  frente a H.



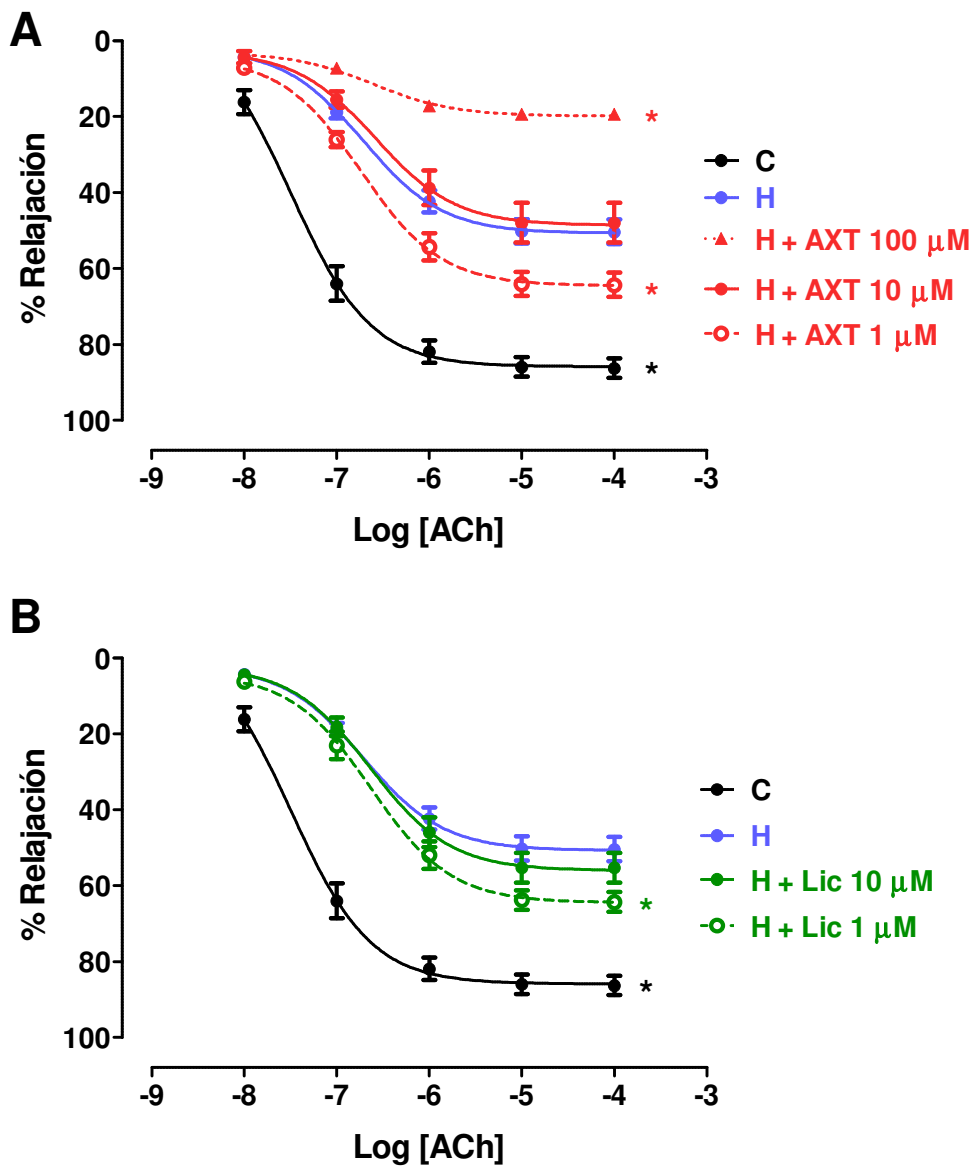
**Figura 53.** Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-11}$ - $3 \times 10^{-7}$  M) en presencia (E+) [A] y ausencia (E-) de endotelio [B] en anillos de arteria aorta control (C) y pretratados durante 4 horas con homocisteína (H). \* $p < 0,05$  frente a H.



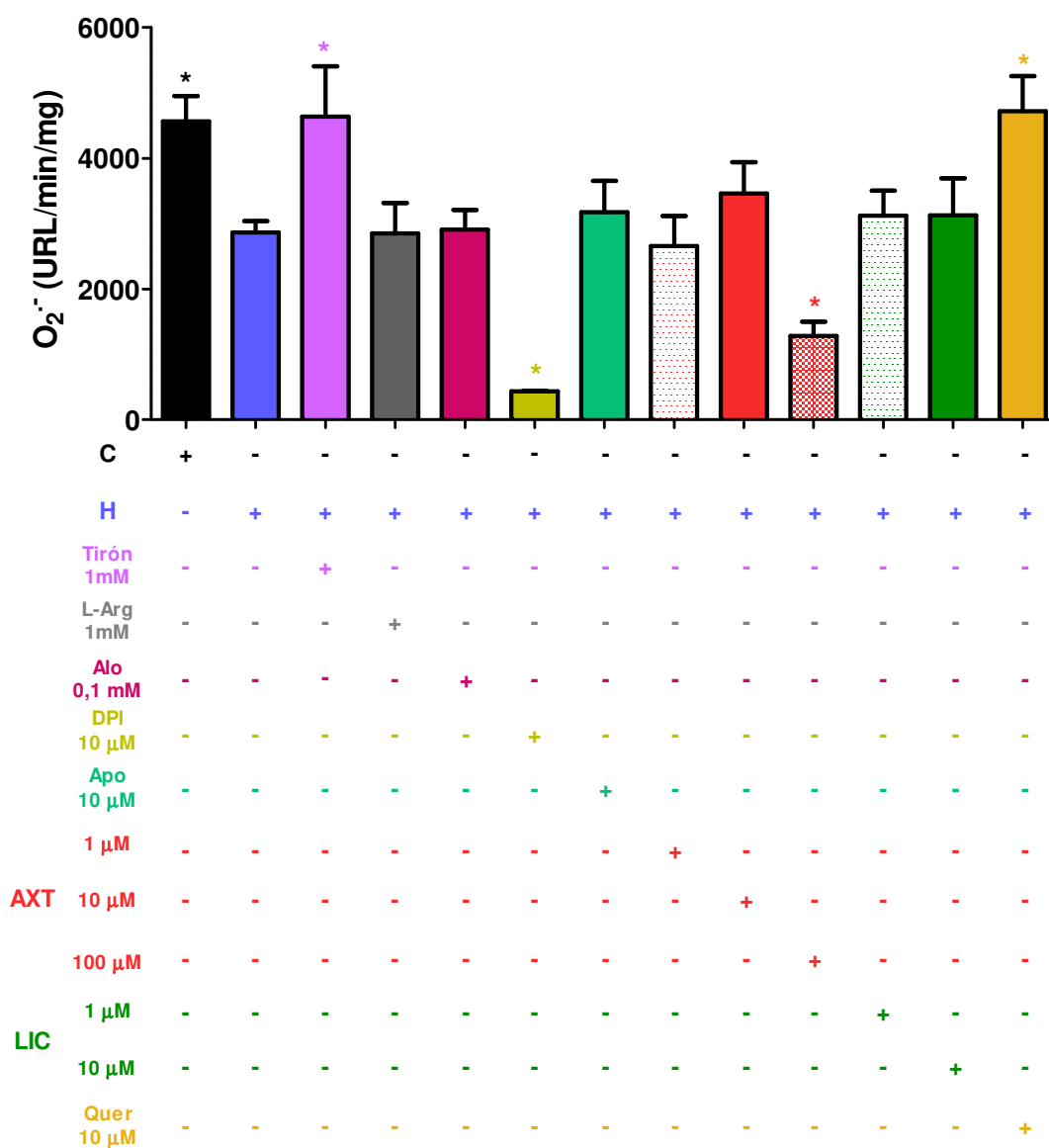
**Figura 54.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en anillos de arteria aorta control (C), pretratados durante 4 horas con homocisteína (H), con homocisteína más tirón 1 mM (H + Tirón) **[A]**, homocisteína más apocinina 100  $\mu$ M (H + Apo) o difenil iodonio 10  $\mu$ M (H + DPI) y difenil iodonio 10  $\mu$ M (DPI) **[B]**. \* $p < 0,05$  frente a H. # $p < 0,05$  frente a H + DPI.



**Figura 55.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en anillos de arteria aorta control (C), pretratados durante 4 horas con homocisteína (H) y con homocisteína más alopurinol 100  $\mu$ M (H + Alo), L-arginina 1 mM (H + L-Arg) [A] o quercetina 10  $\mu$ M (H + Quer) [B]. \* $p < 0,05$  frente a H.



**Figura 56.** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en anillos de arteria aorta control (C), pretratados durante 4 horas con homocisteína (H) y con homocisteína más diferentes concentraciones de astaxantina (H + AXT) **[A]** o diferentes concentraciones de licopeno (H + LIC) **[B]**. \* $p < 0,05$  frente a H.



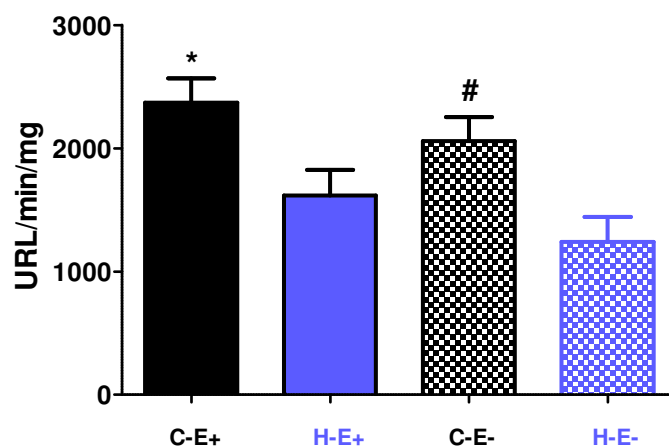
**Figura 57.** Producción de radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) estimulada con NADPH en anillos de arteria aorta control (C), pretratados durante 4 horas con homocisteína (H) y con homocisteína más tirón, L-arginina (L-Arg), alopurinol (Alo), difenil iodonium (DPI), diferentes concentraciones de astaxantina (AXT), diferentes concentraciones de licopeno (LIC) o quercetina (Quer). \* $p < 0,05$  frente al grupo H.

Resultados

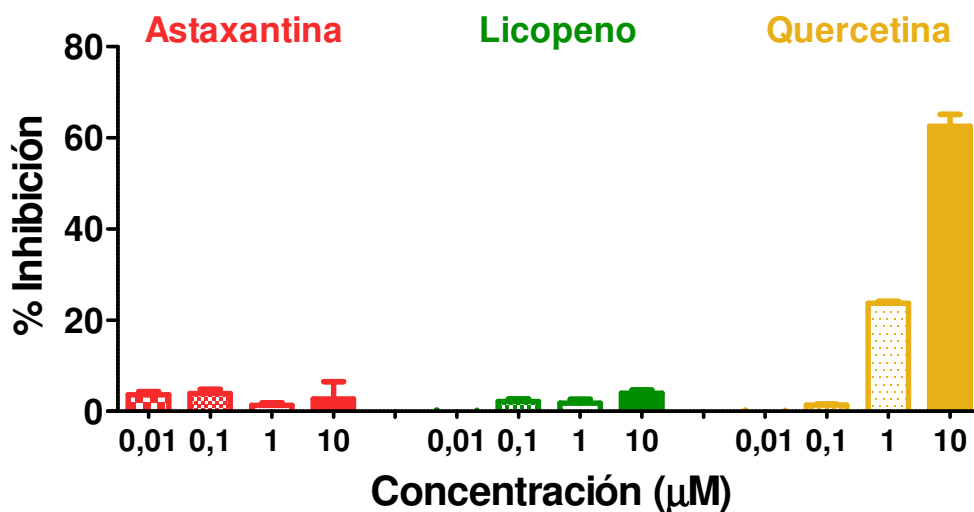
	ACh		$\cdot\text{O}_2^-$
	$E_{\max}$ (%)	$pD_2$	URL/min/mg
<b>C</b>	86,3 ± 2,5*	7,5 ± 0,1	4563 ± 386*
<b>H</b>	50,4 ± 3,2	6,7 ± 0,1	2861 ± 174
<b>H + Tirón 1 mM</b>	88,4 ± 3,4*	7,5 ± 0,2	4638 ± 769*
<b>H + L-Arg 1mM</b>	61,8 ± 5,9*	6,7 ± 0,2	2851 ± 459
<b>H + Alo 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	64,3 ± 4,0*	6,6 ± 0,1	2911 ± 298
<b>H + DPI 10<math>\mu\text{M}</math></b>	2,1 ± 1,1	6,9 ± 0,9	434 ± 9*
<b>H + Apo 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	56,6 ± 5,9	6,6 ± 0,2	3176 ± 477
<b>H + AXT</b>	<b>0,1 <math>\mu\text{M}</math></b>	51,3 ± 5,0	-
	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	64,3 ± 3,2*	2656 ± 462
	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	48,0 ± 5,2	3462 ± 479
	<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	19,3 ± 5,5*	1280 ± 220*
<b>H + LIC</b>	<b>0,1 <math>\mu\text{M}</math></b>	57,6 ± 4,7	-
	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	64,3 ± 2,6*	3120 ± 384
	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	55,2 ± 3,9	3123 ± 571
<b>H + Quer</b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	91,6 ± 3,3*	4715 ± 538*

**Tabla 23.** Valores de relajación máxima ( $E_{\max}$ ) y  $pD_2$  de las curvas de concentración respuesta a acetilcolina (ACh) y producción de radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) estimulada con NADPH en anillos de arteria aorta control (C), pretratados durante 4 horas con homocisteína (H) y con homocisteína más tirón, L-arginina (H + L-Arg), alopurinol (H + Alo), difenil iodonium (H + DPI), diferentes concentraciones de astaxantina (H + AXT), diferentes concentraciones de licopeno (H + LIC) o quercetina (H + Quer). \* $p < 0,05$  frente al grupo H.





**Figura 58.** Producción de radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) estimulada con NADPH en anillos de arteria aorta controles con (C-E+) y sin endotelio (C-E-) y pretratados durante 4 horas con homocisteína con (H-E+) y sin (H-E-) endotelio. \* $p < 0,05$  frente al grupo H-E+ y #  $< 0,05$  frente al grupo H-E-.



**Figura 59.** Capacidad antioxidante, medida como inhibición de la señal de absorbancia obtenida con DPPH (250 mM), de los carotenoides astaxantina y licopeno y del flavonoide quercetina.



## DISCUSIÓN



El SM supone un importante problema de salud pública, principalmente en los países desarrollados<sup>11</sup>. Se estima una prevalencia entre el 20-25% de la población mundial<sup>190</sup>, en España varios estudios la sitúan por encima del 30%<sup>17,18</sup>. Es un síndrome complejo y los criterios para definirlo difieren entre las organizaciones e instituciones sanitarias, aunque todas ellas incluyen la obesidad, la dislipemia, la hipertensión o la resistencia a la insulina como principales alteraciones en los pacientes<sup>1</sup>.

Debido a la implicación del SM en el desarrollo y progresión de las ECV, que continúan siendo la principal causa de morbimortalidad, la investigación en este campo es muy activa y es necesario proporcionar nuevos enfoques para prevenirlo o tratarlo.

Teniendo en cuenta que existe un componente inflamatorio y de estrés oxidativo en el desarrollo del SM<sup>34</sup>, el uso de antioxidantes podría ser una alternativa interesante<sup>191</sup>. En este estudio hemos pretendido evaluar el potencial terapéutico de dietas suplementadas con astaxantina o licopeno para tratar o prevenir el SM. Varios estudios clínicos y en animales exploran la utilidad de los carotenoides en hipertensión, diabetes o arteriopatías, aunque en algunos casos los resultados han sido limitados o contradictorios<sup>162,167</sup>. Para comprender la fisiopatología del SM y abrir nuevas perspectivas de prevención y tratamiento son necesarios modelos animales que reproduzcan sus alteraciones características. Estos modelos experimentales se basan en modificaciones de la dieta (con alto contenido en grasa y/o azúcares), manipulación genética (ratones deficientes en leptina o el receptor de leptina...) o el empleo de fármacos (como antipsicóticos o glucocorticoides)<sup>67</sup>. El exceso de grasa y azúcares sencillos en la dieta junto con el sedentarismo constituyen la principal causa de desarrollo de SM<sup>55</sup>. Por ello, el empleo de dietas ricas en azúcares simples y en grasa refleja los hábitos alimentarios de nuestra sociedad y es un modelo idóneo para estudiar nuevas estrategias farmacológicas.

La creciente prevalencia del SM y el elevado consumo de fructosa y sacarosa durante los últimos años, han llevado a los científicos a establecer una relación entre las dietas altas en fructosa y el desarrollo de este síndrome<sup>35,65,192</sup>. En base a esto, como modelo experimental, utilizamos inicialmente ratas Wistar a las que administramos fructosa en el agua de bebida para desarrollar el SM. Diversos autores indican que, a diferencia de la glucosa, la fructosa no desencadena la liberación de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas<sup>193</sup>. Además, promueve menos la saciedad, por lo que estimula un mayor consumo de alimentos y altera el metabolismo de los

lípidos y carbohidratos, favoreciendo la síntesis y acumulación de grasa<sup>194</sup>. Las dosis de fructosa administradas como componente de la dieta en modelos experimentales animales varían significativamente, desde dosis suprafisiológicas (60%-70%)<sup>195</sup> hasta la concentración habitual en bebidas azucaradas (a menudo entre 10% y 30%)<sup>196,197</sup>. En todos los casos se describen varias de las alteraciones características del SM aunque los resultados no son homogéneos. Esta diversidad puede venir dada por las diferencias en el diseño experimental respecto a la concentración de fructosa, ya comentadas, o por el empleo de distintas cepas de ratas (Wistar, Sprague-Dale, etc) o de distintos tiempos (en referencia al momento en el que se inicia la ingesta de fructosa o a la duración del tratamiento). A nuestro entender, las dietas con más de un 60% de fructosa en su composición no reproducen fielmente los hábitos alimentarios reales. Aunque existen estudios en los que se logra desarrollar el SM con una concentración de fructosa del 10%, los resultados son inconsistentes, por lo que en este trabajo optamos por una dieta enriquecida con un 20%.

Nuestros resultados muestran que con esta dieta no se consiguió desarrollar todos los parámetros indicativos del SM. Por ejemplo, la dieta enriquecida con fructosa no produjo diferencias en el incremento del peso corporal, hecho que tampoco se ha observado en algunos estudios<sup>198-202</sup>, pero sí se ha visto en otros<sup>203-207</sup>. Esto confirma los efectos contradictorios de la fructosa sobre este parámetro. La obesidad es el resultado de un balance energético positivo y la falta de cambios en el peso corporal podría justificarse porque, en nuestro estudio, no hubo diferencias en la ingesta calórica. A pesar de que el consumo de pienso disminuyó en los animales tratados con fructosa, la contribución de la fructosa ingerida en el agua de bebida igualó la ingesta calórica. Aunque se ha descrito que la fructosa estimula la liberación de factores orexígenos y limita la acción de hormonas saciantes como la leptina<sup>72</sup>, la reducción en la ingesta de pienso también se observó en un estudio con ratas Wistar que recibieron la fructosa en el agua de bebida, si bien en este caso, la ingesta calórica total y el peso corporal fueron mayores que en los animales del grupo control<sup>205</sup>. El consumo elevado de fructosa conlleva un incremento en la síntesis y liberación hepática de lípidos que conduce a una acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo. El peligro de la obesidad depende, en gran medida, de la localización de la grasa, siendo la que se acumula en el abdomen la que supone un mayor riesgo cardiovascular. En nuestros experimentos, el grupo de animales tratado con fructosa presentó un índice de grasa abdominal superior al del grupo control, aunque, contrariamente a lo que esperábamos, la diferencia no llegó a alcanzar significación estadística.

Por el contrario, la dieta con fructosa sí que causó un incremento significativo y progresivo de la PAS, alcanzando valores de 150 mmHg al finalizar el estudio, lo que nos sitúa en valores de hipertensión<sup>31</sup>. La HTA mantenida produce importantes alteraciones funcionales y estructurales sobre los órganos encargados de su regulación: corazón, vasos sanguíneos y riñón que contribuyen al aumento de la morbimortalidad del paciente hipertenso. La hipertensión determina una sobrecarga de presión al ventrículo izquierdo (aumento de la poscarga) que desarrolla hipertrofia miocárdica como mecanismo de compensación. También impone una sobrecarga vascular y al riñón, con la consiguiente disfunción endotelial y desarrollo de fracaso renal, respectivamente. La dieta rica en fructosa produjo hipertrofia cardíaca pero no ocasionó cambios macroscópicos significativos en el riñón. Algunos mecanismos que explican el desarrollo de hipertensión como consecuencia del consumo elevado de fructosa son: aumento del gasto cardíaco, la hiperuricemia o el hiperinsulinismo derivado de la resistencia insulínica que aumenta la actividad simpática y activa el sistema renina angiotensina aldosterona incrementando la reabsorción de sodio<sup>208</sup>.

Uno de los parámetros que definen el SM es la resistencia a la insulina que puede ir acompañada de hiperglucemia en ayunas. En nuestro estudio, no hubo cambios en la glucemia basal pero se produjo una reducción significativa de la tolerancia a la glucosa, como reflejan los datos del ABC en el metabolismo de la glucosa son un rasgo común que se describe en la bibliografía, aunque, como en nuestro caso, no siempre se desarrolla hiperglucemia basal en ayunas<sup>199,207</sup>. La disminución de la sensibilidad a la insulina sí es una alteración importante que puede ser la antesala del debut de DM.

Otro de los parámetros clave del SM es la dislipemia. La elevación de los niveles de colesterol y/o TG en plasma favorece el desarrollo de aterosclerosis y aumenta el riesgo cardiovascular<sup>209,210</sup>. Los TG se acumulan en el tejido adiposo y constituyen la forma más eficiente de almacenar energía. Estos no solo provienen de la ingesta de grasa pues el organismo transforma las calorías que no necesita en TG. Así, una gran parte de los hidratos de carbono ingeridos y no utilizados se convierten en TG en el hígado. El HDLc reduce el acúmulo de colesterol en las arterias, por tanto, niveles bajos de HDLc son un FRCV. Las concentraciones de HDLc que se asocian a un aumento del riesgo son < 40 mg/dL para los hombres y < 48 mg/dL para las mujeres. En ocasiones, unos niveles de HDLc elevados pueden compensar cifras de CT por encima de los valores considerados normales. No obstante, conviene destacar que no existen niveles de colesterol óptimos para toda la población, sino que depende de

cada paciente. De hecho, pacientes diabéticos, hipertensos o fumadores tienen una cierta predisposición para que el colesterol se acumule en sus arterias, por eso en estos pacientes se recomiendan niveles de colesterol más bajos<sup>211</sup>.

En el estudio en ratas solo hemos podido determinar los TG, pues los niveles de CT estaban por debajo del límite de detección de la técnica empleada. Los animales que recibieron fructosa presentaron niveles de TG superiores a los obtenidos en el grupo control. La hipertrigliceridemia, salvo contadas excepciones como el estudio llevado a cabo por Oron-Herman y colaboradores<sup>201</sup>, es una constante común de los modelos experimentales de SM inducidos por fructosa.

En relación al tratamiento con los carotenoides, estos se incorporaron en el pienso en una cantidad calculada para conseguir una dosis diaria de 10 mg/kg. La dosis se seleccionó en base a estudios previos realizados tanto en nuestro laboratorio como por otros investigadores en la bibliografía consultada. Ambos tratamientos fueron beneficiosos para reducir los efectos deletéreos de la fructosa sobre la presión arterial, aunque el licopeno se mostró más eficaz que la astaxantina, pues previno el incremento de la presión desde el inicio del tratamiento. Ambos carotenoides redujeron la hipertrofia cardíaca en la misma proporción, con índices próximos a los de los animales control.

Estudios previos realizados por nosotros utilizando diversos modelos experimentales corroboran el efecto antihipertensivo de ambos carotenoides. El tratamiento con 10 mg/kg/día de licopeno previno el incremento de presión arterial y los procesos de remodelado cardíaco inducidos por la administración de angiotensina II y redujo el estrés oxidativo asociado a dicho modelo<sup>182</sup>. La misma dosis resultó eficaz en el tratamiento de la hipertensión en ratas SHR jóvenes, con valores de PAS próximos a los 140 mmHg y adultas, en las que la presión se elevaba por encima de los 175 mmHg y en las que el licopeno disminuyó la presión arterial desde la primera semana de tratamiento<sup>181</sup>. Otros ensayos que investigan el papel del licopeno en la regulación de la presión arterial han proporcionado resultados contradictorios. Varios estudios demostraron que la suplementación oral diaria con licopeno, extracto de tomate o jugo de tomate disminuyó significativamente la presión arterial<sup>212-214</sup>, mientras que otros no mostraron relación<sup>215</sup>. Un artículo publicado recientemente informó sobre la participación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la hipertrofia cardíaca y sugirió que el licopeno podría mediar estos efectos cardioprotectores al mejorar la producción de ERO, inhibir las vías de señalización dependientes de ERO, mejorar la función de las mitocondrias y aumentar



las enzimas antioxidantes<sup>216</sup>. Un metaanálisis realizado por Ried y colaboradores demostró una ligera acción antihipertensiva del licopeno en individuos que presentaban valores de presión arterial superiores a 140 mmHg<sup>214</sup>.

En cuanto a la astaxantina, en un trabajo previo realizado en ratas SHR demostramos una reducción de la PAS con dosis de 75 y 200 mg/kg/día. Cabe destacar que los resultados en algunos de los parámetros evaluados en ese modelo de hipertensión, como la hipertrofia cardíaca, fueron más favorables con la dosis menor de astaxantina<sup>180</sup>. Hussein y colaboradores observaron por primera vez la acción antihipertensiva de la astaxantina. En su trabajo indican que la administración oral de 50 mg/kg/día de astaxantina durante 2 semanas redujo la presión arterial en ratas SHR, pero no en ratas normotensas Wistar Kyoto. También analizaron el efecto de la administración oral de 5 y 50 mg/kg/día durante 5 semanas en ratas SHR-SP y vieron que la aparición del efecto antihipertensor era dependiente de la dosis; la dosis más alta redujo la presión arterial desde la primera semana, mientras que con la dosis más baja, los cambios en la presión arterial no se pusieron de manifiesto hasta finalizar la segunda semana de tratamiento<sup>217</sup>.

Tanto el licopeno como la astaxantina mejoraron la tolerancia a la glucosa reducida por la dieta rica en fructosa. Sin embargo, la astaxantina, a diferencia del licopeno, no revirtió la dislipemia asociada al consumo elevado de fructosa.

Con este modelo experimental no conseguimos desarrollar como queríamos todas las alteraciones características del SM, por ejemplo, esperábamos mayores diferencias en el peso y en el índice de obesidad abdominal o una intolerancia más marcada a la glucosa. Por ello, para los siguientes experimentos optamos por utilizar una dieta rica en grasa y en fructosa que, además, se asemeja más a la dieta que origina el SM en humanos. La mayoría de los estudios que emplean esta estrategia utilizan una dieta rica en grasa y administran la fructosa en el agua de bebida. En nuestro caso, quisimos incorporar todos los componentes en el pienso y, dado que también había que incorporar los carotenoides, consideramos que era más sencillo y versátil si el diseño y la elaboración de las dietas los hacíamos en el laboratorio. La dieta estándar se ajusta a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición<sup>218</sup> y a la composición de la mayoría de las dietas comercializadas para roedores. Para elaborar la dieta rica en fructosa y en grasa se sustituyó parte del almidón (carbohidratos complejos) de la dieta estándar por fructosa y manteca de cerdo. La proporción de estos componentes se seleccionó evitando que las dietas quedaran excesivamente desequilibradas y se alejaran de la realidad. Por ejemplo,

algunos estudios emplean dietas para desarrollar el SM donde la grasa o la fructosa contribuyen más de un 60% al contenido calórico total<sup>204,201,219,220</sup>. Por otra parte, estudios llevados a cabo por Poudyal y colaboradores<sup>221</sup> y Senaphan y colaboradores<sup>222</sup>, que emplean dietas ricas en grasa y fructosa, incorporan la fructosa tanto en el pienso como en el agua de bebida, dando lugar a dietas muy alejadas de la composición de las que consumen los humanos, a pesar de que el consumo de azúcares simples sea elevado.

La ingesta calórica debe estar equilibrada con el gasto calórico. Según las recomendaciones de la OMS, las grasas no deberían superar el 30% de la ingesta calórica total, limitando el consumo de grasas saturadas por debajo del 10%. Por otra parte, la ingesta de azúcar libre debería representar menos del 10% de la ingesta calórica total<sup>223</sup>. En nuestro estudio, la contribución de las grasas y grasas saturadas de la dieta elaborada por nosotros es del 39 y 34%, respectivamente. La fructosa contribuye alrededor de un 20% al contenido calórico total. La aportación de fructosa es ligeramente superior, pues el pienso contiene también sacarosa. Así, los azúcares sencillos contribuyen en torno a un 28% al contenido energético total en la dieta rica en fructosa y en grasa. No obstante, la sacarosa también se incorpora en la misma proporción en la dieta estándar. En definitiva, la dieta enriquecida en fructosa y en grasa diseñada por nosotros no se ajusta a las recomendaciones citadas y parecía adecuada para conseguir el desarrollo del SM. Además, el contenido en grasa y azúcares sencillos es muy similar al de las dietas empleadas por Zhang y colaboradores<sup>224</sup> y Yang y colaboradores<sup>225</sup> para desarrollar el SM en ratas y ratones, respectivamente.

La incorporación de carboximetilcelulosa sódica obedece a criterios tecnológicos, con el objeto de aumentar la consistencia de los pellets de pienso, pues la incorporación de manteca de cerdo da una consistencia semisólida difícil de manejar. Este derivado de celulosa, que contribuye al contenido total de fibra, no se incluyó en la dieta estándar, ya que aumentaba en gran medida la dureza del pienso y era rechazado por los animales.

Para todos los estudios con dieta enriquecida con grasa y fructosa, se emplearon ratones macho C57BL/6J. El menor consumo de pienso por los ratones y su manipulación más sencilla, unido a que se trata de una cepa muy empleada en el estudio del SM motivó el cambio a esta especie animal. Al igual que en el ensayo realizado en ratas, se utilizaron machos debido a la menor influencia hormonal en los

parámetros bioquímicos y a que presentan mayor susceptibilidad que las hembras al estrés oxidativo y la inflamación<sup>226</sup>.

Los controles periódicos del peso corporal realizados en el transcurso del estudio indicaban que no había diferencias entre el grupo alimentado con la dieta estándar y el que recibió la dieta rica en fructosa y en grasa. Este es un parámetro que se suele incrementar en la mayoría de los estudios que utilizan animales alimentados con dietas enriquecidas con estos componentes, aunque no siempre es así<sup>219,222</sup>. Un análisis de estos trabajos, tanto los que presentan incrementos positivos, como aquellos que eran negativos, muestra una ingesta calórica siempre inferior en el grupo control. En nuestro caso, tuvimos dificultades para determinar la ingesta de los animales alimentados con la dieta estándar elaborada por nosotros, pues los pellets de pienso mostraban una elevada friabilidad y resultaba complicado pesar el pienso sobrante. A pesar de ello, hemos podido estimar la ingesta calórica del grupo control que fue similar al del resto de grupos evaluados, lo que podría justificar la ausencia de efectos sobre la ganancia de peso.

Aunque no hubo cambios en el peso corporal total, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de grasa abdominal. La obesidad abdominal es una de las características principales del SM. La hipertrofia del tejido adiposo explica muchas de las características del SM, como el desarrollo de resistencia insulínica, la inflamación y el estrés oxidativo<sup>53</sup>.

Para evaluar la resistencia a la insulina se empleó la prueba de tolerancia a la glucosa, que es una alteración frecuente observada en los estudios de SM<sup>227,221,228</sup>. El ABC, que es una medida de la exposición del organismo a la glucosa durante la prueba, fue superior en los animales que habían recibido fructosa y grasa. Esta disminución de la sensibilidad a la insulina fue significativa ya a las 8 semanas y empeoró con el tiempo, como muestra la recuperación más lenta de la glucemia basal en animales con SM respecto a los controles.

La fructosa es rápidamente captada por el hígado, siendo su principal destino la síntesis de ácidos grasos, que se convierten en TG y se empaquetan con apolipoproteínas específicas formando las VLDL. Este carácter lipogénico de la fructosa, unido al aumento en la ingesta de grasa, llevaría a pensar en un incremento en los niveles plasmáticos de TG, pero, de forma sorprendente, no hubo diferencias a este nivel. Sin embargo, el colesterol sí aumentó de manera significativa en el grupo alimentado con fructosa y con grasa. La elevación del CT también explica el aumento del LDLc y del HDLc, a pesar de que este último suele estar disminuido en el SM. La

dislipemia es una alteración frecuente en el SM, siendo variable el perfil lipídico obtenido en los diferentes estudios. Generalmente, aumentan los niveles de TG, CT y LDLc y disminuyen los valores de HDLc. El perfil que obtuvimos en nuestro estudio también ha sido descrito en el trabajo realizado por Yang y colaboradores, en el que una dieta enriquecida en grasa y sacarosa incrementó el CT en torno a un 100%, aumentando tanto el LDLc como el HDLc, pero no modificó la concentración de TG en plasma<sup>225</sup>.

La presión arterial no se modificó a lo largo del estudio. Aunque la HTA también aparece de forma frecuente en el SM, no siempre se observan cambios a este nivel. En un estudio, llevado a cabo en ratones alimentados con una dieta más rica en fructosa y grasa que la nuestra y una duración de 8 meses, Dissard y colaboradores no observaron tampoco incrementos de la presión arterial<sup>229</sup>. La hipertrofia cardíaca y renal forman parte del remodelado asociado a cifras de presión arterial elevadas de forma persistente, por lo que es razonable que tampoco se obtuvieran diferencias entre los grupos.

Una de las consecuencias del SM es el desarrollo de EHGNA, caracterizado por la acumulación hepática de grasa, que puede evolucionar hacia el desarrollo de fibrosis, cirrosis e, incluso, hepatocarcinoma. En su fisiopatología están implicados mecanismos inflamatorios y de estrés oxidativo<sup>95</sup>. En nuestro estudio, el análisis histológico de cortes de hígado muestra que el consumo de una dieta rica en fructosa y en grasa dio lugar a esteatosis macrovesicular, caracterizada por la acumulación de gotas de grasa de gran tamaño en el interior de los hepatocitos. Sin embargo, no se detectaron cambios en la arquitectura celular ni signos de daño hepatocelular o fibrosis, resultados que van en la línea de los obtenidos en estudios similares, donde los cambios histológicos más importantes observados han sido la presencia de vacuolas que indican la acumulación de grasa en los hepatocitos<sup>225,229</sup>.

Las alteraciones propias del SM afectan también a los vasos sanguíneos. La hipertensión, el estrés oxidativo o la inflamación ocasionan daño y contribuyen al remodelado estructural y a la alteración funcional características de patologías cardiovasculares<sup>230</sup>. Como hemos comentado más arriba, en nuestro modelo, la ingesta de fructosa y grasa no produjo incremento de los valores de presión arterial, lo que podría explicar que la relajación a ACh en anillos de aorta, un indicador de daño endotelial, fuera similar en los grupos DE-L y FG-L. La pérdida de relajación dependiente de endotelio se recoge en varios estudios sobre SM inducido por la dieta, sobre todo cuando va acompañado de cambios en la presión arterial o en los

niveles de mediadores de estrés oxidativo o de la inflamación vascular<sup>231</sup>. Como en nuestro trabajo, Soares y colaboradores tampoco encontraron cambios en la respuesta a ACh en aortas de ratones alimentados durante 16 semanas con una dieta rica en grasa. En este caso, los autores detectaron un aumento de la IL-10, que podría ejercer una acción antiinflamatoria<sup>232</sup>.

La respuesta contracturante a agonistas como la FE sí se vio afectada, siendo significativamente inferior en los animales que habían recibido el pienso enriquecido en fructosa y en grasa. Este efecto puede sorprender si consideramos que en el SM se produce un aumento de ERO, como los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ , que pueden neutralizar el NO que, liberado en condiciones basales, actúa manteniendo cierta vasodilatación. La disminución de la biodisponibilidad del NO nos llevaría a pensar en un incremento potencial de la respuesta contracturante del músculo liso vascular, al suprimir su influencia vasodilatadora. Respecto a las respuestas vasoconstrictoras hay resultados contradictorios, si bien Ghatta y colaboradores vieron un aumento en la contracción mediada por FE en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta enriquecida en grasa<sup>233</sup>, la disminución de la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica ha sido descrita en otros estudios más recientes. Según algunos autores, la pérdida de contracción se debe a alteraciones en la señalización mediada por los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, resultando afectada la vía del receptor  $\text{IP}_3$ . De hecho, en ratones C57BL/6J normales observaron que la incubación con heparina (antagonista del receptor de  $\text{IP}_3$ ) y con GFX (inhibidor de PKC) reducía la contracción a FE o se abolía cuando la incubación se realizaba con los dos compuestos pero, en los ratones obesos, solo la inhibición de PKC con GFX disminuía la contracción lo que indica un menor papel del receptor  $\text{IP}_3$  en estos animales<sup>232,234</sup>.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores podemos concluir que la dieta rica en fructosa y en grasa alteró varios de los parámetros metabólicos que caracterizan el SM. Sin embargo, ni el licopeno ni la astaxantina previnieron la aparición de obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipercolesterolemia y alteración de la respuesta vasoconstrictora adrenérgica. Además, en el caso de la astaxantina, cuando se incrementó la dosis se empeoraron algunos indicadores como el índice de grasa abdominal. Esto está en disonancia con los resultados más o menos prometedores conseguidos con ambos carotenoides en el estudio preliminar con ratas Wistar, en las que se indujo el SM con fructosa en el agua de bebida y con un trabajo publicado por nuestro grupo con licopeno<sup>235</sup>.

Por otra parte, tanto el licopeno como la astaxantina han mostrado potencial terapéutico en el SM en otros ensayos. Aunque los estudios con licopeno en el SM en animales son limitados, destacan dos estudios donde se han obtenido buenos resultados. En ratas Wistar macho que recibieron fructosa en el agua de bebida (10%), la administración de 4 mg/kg/día de licopeno fue capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina<sup>236</sup>. En ratones C57BL/6J alimentados con una dieta rica en grasa, el licopeno también logró prevenir la dislipemia y las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, mostró acción antiinflamatoria y redujo la acumulación hepática de lípidos<sup>237</sup>. Por su parte, la astaxantina (50 mg/kg/día) mostró buenos resultados en ratas SHR y con SM, donde redujo la PAS y la glucemia en ayunas y mejoró la sensibilidad a la insulina y el perfil lipídico<sup>238</sup>. Sin embargo, Preuss y colaboradores estudiaron el efecto de dos dosis de astaxantina (5 y 25 mg/kg/día) en ratas Zucker obesas y, aunque la astaxantina logró reducir la PAS, no fue capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina<sup>239</sup>. Estos mismos investigadores observaron una relación dosis-respuesta en un modelo de resistencia a la insulina e hipertensión inducido por una dieta rica en sacarosa. En este caso, solo las dosis más altas (50 y, especialmente 100 mg/kg/día) lograron reducir la resistencia insulínica y la presión arterial<sup>240</sup>. La suplementación con astaxantina (0,03%) también inhibió la inflamación y la fibrosis hepática en un modelo de esteatohepatitis inducido por la dieta en ratones<sup>241</sup>. Ni y colaboradores también vieron la capacidad de la astaxantina de reducir la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática, así como la inflamación asociada en ratones alimentados con una dieta rica en grasa y colesterol<sup>242</sup>.

El diseño de este estudio incluyó un grupo control con animales alimentados con el pienso comercial utilizado en ese momento en el SEA de la USAL. Sorprendentemente, se encontraron importantes diferencias en la mayor parte de los parámetros evaluados, entre los animales alimentados con la dieta estándar comercial y los que recibieron la dieta elaborada por nosotros. De hecho, el grupo que recibió la dieta comercial tuvo un comportamiento más similar al grupo alimentado con el pienso enriquecido en fructosa y en grasa elaborado por nosotros en el laboratorio. Las diferencias fueron aún más acusadas en el peso corporal y la obesidad abdominal, con valores muy superiores a los obtenidos con cualquiera de las dietas elaboradas por nosotros. Si consideramos que el desarrollo de SM tiene lugar cuando diferentes parámetros se desvían del grupo control, podemos considerar que se obtuvo con la dieta elaborada en el laboratorio, aunque si se compara con el grupo que recibió la dieta estándar comercial, no hubo tal desarrollo. En este punto nos planteamos varios interrogantes: ¿podríamos inferir que la dieta

comercial sea perjudicial y altere diferentes parámetros metabólicos? ¿Y si es la dieta elaborada por nosotros la que no es adecuada? El aspecto y comportamiento de los animales durante todo el estudio fue normal, sin signos de deficiencias nutricionales. Sin embargo, nos llamaron la atención dos aspectos. Por un lado, se detectó una reducción del peso corporal en las primeras semanas de estudio tras el cambio de la dieta estándar comercial por las dietas elaboradas en el laboratorio, tanto la estándar como la rica en fructosa y en grasa. Por otra parte, aunque no se detectaron alteraciones histológicas en los cortes de hígado, la actividad de las aminotransferasas fue significativamente superior en el grupo de animales que recibieron nuestra dieta. Tanto AST como ALT se emplean como marcadores de daño hepatocelular y el incremento de su actividad se relaciona con alteraciones hepáticas. En el estudio llevado a cabo por Vedova y colaboradores, los niveles de ALT, aminotransferasa específica del hígado, fueron superiores en los animales que recibieron una dieta alta en grasa y fructosa, grupo que desarrolló esteatosis hepática. Sin embargo, cabe destacar que la actividad de AST fue mayor en el grupo alimentado con una dieta baja en grasa<sup>227</sup>.

Como ya se comentó en el apartado de resultados, la ausencia de cambios en parámetros importantes como el peso corporal con la dieta diseñada por nosotros, nos llevó a plantear un estudio adicional enriqueciendo el pienso comercial con fructosa y con grasa. Las diferencias encontradas entre la dieta estándar comercial y la elaborada en el laboratorio hacían pensar que el SM se desarrollaría antes y con mayor intensidad si empleábamos la dieta comercial como base. Con esta nueva modificación, se observó un incremento significativo del peso corporal desde la cuarta semana de tratamiento. Además, a las 8 semanas también había una marcada disminución de la tolerancia a la glucosa, aunque la glucemia basal tampoco se modificó. Estos resultados nos hicieron pensar que con esta nueva dieta podríamos evaluar mejor el efecto de los carotenoides. En este punto del ensayo se inició el tratamiento con los carotenoides, suplementando el pienso rico en fructosa y en grasa con un 0,01% de astaxantina o licopeno. No se empleó el pienso con mayor porcentaje de astaxantina, pues en el modelo anterior algunos parámetros incluso empeoraron con esa proporción.

Al finalizar el estudio, el peso corporal de los animales que habían recibido una dieta rica en fructosa y en grasa fue significativamente superior al alcanzado por los ratones alimentados con el pienso comercial, justificado en este caso por la ingesta calórica. Aunque no hubo diferencias significativas en el consumo de pienso,

el contenido calórico de la dieta enriquecida con fructosa y con grasa es superior. Los animales también desarrollaron obesidad abdominal, disminución de la tolerancia a la glucosa y, a diferencia del modelo anterior, hiperglucemia basal. Sin embargo, tampoco se obtuvieron cambios en la presión arterial que explican la ausencia de modificaciones en el remodelado del corazón y del riñón. En relación al perfil lipídico, los niveles de colesterol (total, LDLc y HDLc) siguieron un patrón similar al obtenido con la dieta elaborada en el laboratorio. No obstante, en este caso, se produjo un ligero incremento de los niveles de TG.

La dieta rica en fructosa y en grasa produjo una marcada esteatosis hepática aunque sin signos histológicos de fibrosis o daño hepatocelular. Cabe citar la elevación en los niveles de ALT, aunque no llega a ser estadísticamente significativo. Todos estos cambios podrían sugerir el inicio del desarrollo de EHGNA.

En cuanto a los estudios de funcionalidad vascular, se repitieron de nuevo las diferencias encontradas en la contracción. Se observó una reducción de la contracción a FE y 5-HT en los animales alimentados con la dieta rica en fructosa y en grasa. La afectación de la respuesta a ambos agonistas confirma la idea de que las alteraciones se produzcan a nivel de los mecanismos de transducción de la señal y no a nivel de receptor. En la pérdida de contracción tampoco están implicados mecanismos relacionados con el NO, pues al inhibir la NOS, si bien se obtiene un aumento de la respuesta contracturante, se mantienen las diferencias entre los dos grupos en la misma proporción.

En los dos modelos experimentales desarrollados en ratón se han obtenido, en mayor o menor medida, tres de las cuatro alteraciones principales que definen el SM: obesidad abdominal, alteraciones en el metabolismo de la glucosa y dislipemia. En ninguno de los dos se ha observado elevación de la presión arterial, otra de las características clave del SM. Desde el punto de vista cualitativo, apenas hay diferencias entre el SM obtenido con la dieta diseñada por nosotros y la dieta rica en grasa y fructosa utilizando el pienso comercial como base para su elaboración. El peso corporal, la glucemia en ayunas y los niveles plasmáticos de TG son los parámetros que, adicionalmente, se han alterado en el segundo modelo empleado.

El tratamiento durante 10 semanas con astaxantina o licopeno no revirtió ninguno de los parámetros metabólicos y bioquímicos alterados por el consumo de una dieta enriquecida en fructosa y en grasa. Esta falta de actividad, al igual que la observada en el anterior modelo de SM en ratones, nos sorprendió, dados los resultados prometedores obtenidos con el modelo de SM en ratas y los antecedentes



previos con otros modelos de ECV, además de los estudios consultados en la bibliografía.

Antes de continuar con el análisis de los resultados, cabe citar que algunos investigadores de la Universidad de Salamanca han advertido que los animales alimentados con el pienso actual proporcionado por el SEA tienen pesos significativamente superiores a los alimentados con el pienso anterior. El SEA hace un tiempo se vio obligado a cambiar a otro proveedor de pienso, lo que ha podido suponer una limitación importante y podría explicar el aumento de peso observado en los animales alimentados con el pienso comercial.

En vista de los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* se han llevado a cabo una serie de estudios *in vitro* en los cuales, mediante la generación de ERO, se incrementa el estrés oxidativo y se provoca disfunción endotelial. Con dichos ensayos tratamos de analizar si la astaxantina o el licopeno, en base a su capacidad antioxidante, podrían revertir o impedir ese daño.

El estrés oxidativo desempeña un papel clave en el desarrollo de la disfunción vascular presente en el SM y las ECV<sup>243</sup>. Se puede definir como una situación de desequilibrio entre la producción de moléculas oxidantes frente a la capacidad antioxidante del organismo, a favor de las primeras. Fisiológicamente, las ERO regulan diversos procesos celulares en el sistema cardiovascular como diferenciación, proliferación, apoptosis, migración, secreción, activación de factores de transcripción y expresión génica, sin embargo, también tienen un papel fisiopatológico<sup>244</sup>. Un incremento en su biodisponibilidad contribuye a la disfunción endotelial y el remodelado cardiovascular en la HTA y otras enfermedades cardiovasculares<sup>106</sup>.

La activación de enzimas que generan ERO (como Noxs, NOS desacoplada o enzimas mitocondriales) en células endoteliales y células de músculo liso vascular por diversos estímulos (agentes vasoactivos, factores de crecimiento, citocinas o estímulos mecánicos) conduce a una disminución de la biodisponibilidad del NO y un aumento de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>98</sup>.

Las ERO influyen en el desarrollo y progresión de la enfermedad vascular mediante la activación de determinadas vías de señalización.  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  estimulan MAPK, tirosina cinasas, Rho cinasas y factores de transcripción e inactivan tirosina fosfatasas. Además, inducen la expresión y actividad de PECAM, ICAM y VCAM y participan en la regulación del tono vascular. Por una parte, los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  disminuyen la biodisponibilidad de agentes vasodilatadores como el NO por la

formación de peroxinitrito y por otra, el  $H_2O_2$  parece tener acción vasodilatadora. También modulan la concentración intracelular de calcio que es un elemento importante en el proceso de contracción-relajación vascular<sup>112</sup>.

En el primer modelo de disfunción vascular desarrollado utilizamos pirogalol. La incubación de anillos de aorta de rata Wistar con pirogalol durante 15 minutos disminuyó la relajación máxima dependiente de endotelio. El pirogalol es un compuesto que se autooxida de forma espontánea, formando radicales  $\cdot O_2^{-245}$  que reaccionan con el NO para dar una molécula muy oxidante, el ONOO<sup>-</sup>. Por un lado, se reduce la disponibilidad de NO (generado por la interacción de ACh sobre receptores muscarínicos en las células endoteliales) y, por otro, los radicales generados también producen el desacoplamiento de la NOSe que pasa a generar más radicales  $\cdot O_2^{-}$  en lugar de NO. De esta forma, la producción de radicales  $\cdot O_2^{-}$  y su efecto perjudicial se retroalimenta y se amplifica<sup>246</sup>. La relajación máxima a NTP no se vio afectada debido a que el NO se aporta de forma exógena y no tiene que generarse a nivel endotelial. Sin embargo, se redujo la sensibilidad a este agonista, con un desplazamiento de la curva concentración-respuesta a la derecha. Podríamos inferir que cuando se incrementa la concentración de NTP aumenta el aporte de NO que supera la capacidad neutralizadora de los radicales  $\cdot O_2^{-}$ , haciendo que su disponibilidad sea suficiente para ejercer la respuesta vasodilatadora y no se altere el Emax. La pérdida de sensibilidad al NTP también se observó al eliminar el endotelio, confirmando la neutralización del NO por parte de los radicales  $\cdot O_2^{-}$ . La incubación con SOD revirtió todas las alteraciones descritas, indicando la implicación de los radicales  $\cdot O_2^{-}$  en el daño producido por pirogalol. La producción de radicales  $\cdot O_2^{-}$  inducida por la incubación de los anillos con pirogalol también se puso de manifiesto por un incremento de la respuesta contracturante.

La concentración de pirogalol utilizada se seleccionó en base a estudios previos realizados en nuestro laboratorio. La concentración de 10  $\mu M$  se consideró óptima, pues demostró que era capaz de disminuir significativamente la respuesta dependiente de endotelio sin anularla. Este proceso de selección tiene su importancia, pues un estudio realizado por Demirci y colaboradores mostró un comportamiento dual del pirogalol, donde concentraciones inferiores a 1  $\mu M$  mejoraban la respuesta a la ACh y concentraciones de 10  $\mu M$  o superiores, producían una pérdida de la relajación<sup>247</sup>. La concentración de pirogalol utilizada en nuestro trabajo también se usó en otro estudio para evaluar la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de *Phoebe grandis*, obteniendo una respuesta máxima a ACh

ligeramente superior a la obtenida por nosotros<sup>248</sup>. Sin embargo, en otros estudios, para conseguir disminuir la respuesta relajante, emplean concentraciones hasta de 500  $\mu\text{M}$ <sup>249</sup>.

Al estudiar el efecto de la astaxantina y del licopeno nos sorprendió que ninguno de los dos carotenoides fuera capaz de prevenir el daño provocado por el pirogalol. No pudimos evaluar concentraciones superiores de ambos carotenoides pues para su disolución se emplea DMSO y hubiese sido necesario añadir un volumen elevado de este vehículo. También evaluamos el efecto de quercetina, antioxidante ampliamente estudiado y con numerosas propiedades farmacológicas<sup>250</sup>. Se observó que este flavonol sí era capaz de prevenir el efecto del pirogalol, especialmente en la respuesta al NTP. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en la valoración antioxidante con DPPH donde solo 10  $\mu\text{M}$  de quercetina, concentración empleada en este ensayo, fue eficaz. La ausencia de actividad de la astaxantina y del licopeno en el ensayo DPPH concuerda con los resultados obtenidos por Muller y colaboradores, que no detectaron neutralización del radical DPPH con ninguno de los carotenoides que estudiaron<sup>251</sup>. Aunque en este caso la astaxantina no mostró actividad, en otro trabajo, Regnier y su equipo encontraron que era capaz de reducir el radical ABTS+ y evitar la degradación de fluoresceína, siendo más potente la astaxantina de fuentes naturales que la obtenida de forma sintética<sup>252</sup>. No obstante, en nuestro estudio hemos utilizado astaxantina procedente de *Haematococcus pluvialis*.

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de reactividad vascular nos propusimos corroborar, mediante ensayos de quimioluminiscencia, si los compuestos estudiados eran capaces de captar los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  producidos por la autooxidación del pirogalol. Como era de esperar, la SOD redujo los niveles de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ , debido a su acción neutralizadora. La astaxantina y el licopeno no redujeron la señal de quimioluminiscencia, lo cual era de esperar a la luz de los resultados de funcionalidad con pirogalol y DPPH y confirma que no tienen capacidad captadora directa de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ . Sin embargo, nos sorprendió que el resultado fuera también negativo para quercetina. Este hallazgo inesperado se podría deber a que en este ensayo de quimioluminiscencia no hay anillos de arteria presentes y, por lo tanto, tampoco ninguno de los mecanismos antioxidantes de los que dispone el tejido.

En el segundo modelo de disfunción vascular quisimos estudiar el efecto de nuestros compuestos sobre la contracción que generan los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  producidos

en la reacción enzimática catalizada por la XO<sup>253</sup>. La incubación con SOD redujo la respuesta contracturante, lo que nos confirma que en la reacción se generan radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ . Algunos autores atribuyen la contracción a la formación de radicales hidroxilo<sup>254</sup>, si bien estos se forman a partir de los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ . Por otra parte y como era de esperar, alopurinol, inhibidor de la XO, también disminuyó la contracción. Sin embargo, ninguno de los carotenoides ni quercetina modificaron la respuesta contracturante, reproduciendo los resultados obtenidos en la disfunción provocada por el pirogalol. La ausencia de actividad a este nivel contrasta con los resultados obtenidos por Hussein y colaboradores, que sí observaron una reducción en la contracción producida por el sistema xantina/XO en un modelo similar al nuestro con concentraciones de astaxantina de 10 y 0,1  $\mu\text{M}$ <sup>217</sup>. También difieren de los resultados obtenidos en los estudios de quimioluminiscencia. Al igual que en el caso del pirogalol, se trata de un ensayo en ausencia de tejido. Los resultados fueron los esperados para el alopurinol y la SOD pero, en este caso el licopeno redujo los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  generados por el sistema xantina/XO de forma concentración-dependiente, la astaxantina fue capaz de reducir la señal de luminiscencia con la concentración más alta ensayada y la quercetina se acercó a la actividad del alopurinol y de la SOD. Cabría pensar una posible acción inhibitoria de la astaxantina y del licopeno sobre la XO, dado que en el ensayo con pirogalol no mostraron capacidad captadora de radicales. En este sentido, el licopeno logró reducir la actividad plasmática y muscular de XO en un ensayo realizado en ratas sometidas a ejercicio intenso<sup>255</sup>. Sin embargo, la actividad inhibitoria de la astaxantina no se puso de manifiesto en estudios *in vitro* llevados a cabo por Dose y colaboradores<sup>256</sup>.

En una tercera serie de experimentos se empleó un modelo de disfunción endotelial inducido por homocisteína. Diversos estudios han mostrado la relación entre niveles elevados de homocisteína y la aparición de disfunción endotelial y aterosclerosis<sup>186,257</sup>. Este modelo es más complejo que los anteriores al participar diferentes mecanismos y nos permite estudiar los efectos perniciosos de la homocisteína sobre la reactividad vascular, la relación de estos con el estrés oxidativo y el efecto de los carotenoides.

En nuestro estudio, la incubación con homocisteína durante 4 horas produjo una marcada pérdida de la relajación a ACh. La concentración empleada fue la misma que la utilizada en otros estudios, aunque el tiempo de incubación fue superior<sup>258</sup>. En los ensayos preliminares, se observó una pérdida de la capacidad de respuesta de los anillos control tras la incubación con la misma solución Krebs durante 4 horas (datos

no mostrados). Esto motivó un ajuste en la metodología respecto a otros estudios, donde las curvas concentración-respuesta se realizaron cinco minutos después de renovar la solución nutritiva. La renovación de la solución Krebs permite recuperar la respuesta a ACh del anillo control de forma completa pero no así la de los anillos incubados con homocisteína. Al cambiar la solución nutritiva, se eliminan todos los compuestos añadidos, incluyendo la homocisteína, permitiendo valorar los daños ocasionados por este agente que persisten tras su eliminación del baño. La contracción a FE también aumentó en los anillos incubados con homocisteína. Sin embargo, no se modificó la respuesta al NTP, tanto en presencia como en ausencia de endotelio, lo que coincide con lo descrito por otros autores<sup>258,259</sup>.

El estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos descritos para explicar la disfunción endotelial producida por la homocisteína. El tirón, compuesto con capacidad captadora de radicales  $\cdot O_2^-$ , revirtió la pérdida de relajación, lo que confirma la implicación del estrés oxidativo en el daño endotelial. La autooxidación de la homocisteína ha sido una de las vías propuestas para explicar el aumento del estrés oxidativo<sup>260</sup>. Sin embargo, su papel ha sido cuestionado debido a que otros aminoácidos con grupos tiol y presentes en concentraciones más elevadas que la homocisteína (como la cisteína) también se autooxidan pero no afectan al balance redox<sup>261</sup>. Las principales fuentes de producción de radicales  $\cdot O_2^-$  son la mitocondria, la XO, las NADPH oxidasas y la NOSe desacoplada. El estrés oxidativo inducido por homocisteína puede implicar a los dos últimos sistemas enzimáticos por un aumento de la expresión de NADPH oxidasas o desacoplamiento de la NOSe además de otros mecanismos como la disminución de antioxidantes endógenos (glutación, vitamina E) o la alteración de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, GPx...)<sup>186</sup>.

Nox2 es la principal isoforma de las NADPH oxidasas a nivel endotelial y se ha descrito una relación positiva entre los niveles de homocisteína y la expresión de Nox2 en células endoteliales humanas y en cardiomiocitos de rata<sup>262,263</sup>. Para comprobar si esto podría ser responsable de la pérdida de relajación en uno de nuestros ensayos utilizamos dos inhibidores de las NADPH oxidasas (apocinina y DPI). La incubación simultánea con apocinina no alteró la respuesta observada con homocisteína sola mientras que el DPI anuló prácticamente la relajación. En contra de lo esperado y descrito en otros trabajos<sup>258</sup>, el DPI lejos de revertir la pérdida de relajación, la empeoró de forma drástica. Esto nos llevó a ensayar solo el DPI y comprobamos que la incubación con este agente prácticamente anuló la respuesta a ACh. El DPI es un inhibidor inespecífico, que podría interferir con otros sistemas

enzimáticos, como la NOS, y que podrían explicar la pérdida tan acusada de la relajación. Además, el DPI puede tener incluso un efecto prooxidante<sup>264</sup>. Por otra parte, las distintas isoformas de la Nox parecen contribuir de modo diferente al desarrollo de disfunción endotelial. Smith y colaboradores observaron, mediante el empleo de inhibidores específicos de las diferentes isoformas, que la inhibición de Nox1 en arteria aorta de conejo previno mientras que la inhibición de Nox4 empeoró la relajación inducida por la ACh<sup>265</sup>. Por su parte, Nox2 no pareció tener ningún efecto. Esto hace pensar en una contribución más compleja de las Noxs en el efecto de la homocisteína.

Según la bibliografía la homocisteína aumenta la expresión de las Noxs, por lo que determinamos por quimioluminiscencia la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  estimulada con NADPH. Este ensayo se realizó utilizando los mismos anillos en los que se habían llevado a cabo los estudios de reactividad vascular. Sorprendentemente, se observó lo contrario de lo esperado y lo recogido en ensayos realizados con cultivos celulares por otros autores<sup>266-268</sup>, pues la señal de luminiscencia fue menor en los anillos que habían estado en presencia de homocisteína durante 4 horas. La producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  no se modificó en los anillos que habían sido incubados con homocisteína y apocinina pero fue significativamente inferior en los anillos incubados simultáneamente con homocisteína y DPI o solo con DPI, que en el caso del DPI concuerda con su efecto inhibitor sobre las Noxs. Los anillos incubados con tirón mostraron una producción estimulada de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  similar a la de los anillos control, resultado que coincide con la capacidad del tirón para revertir la pérdida de relajación.

Por otra parte, la interferencia en la vía del NO es uno de los mecanismos más importantes de daño endotelial descritos para la homocisteína. El aumento de la producción de ERO por parte de la homocisteína conduce al desacoplamiento de la NOSe que, a su vez, aumenta la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  y reduce la formación de NO<sup>269</sup>. También se ha propuesto que la homocisteína inhibe el transporte al interior celular de L-arginina, aminoácido precursor de la síntesis de NO, debido a que comparten el mismo transportador. En este sentido, la pérdida de relajación ocasionada por homocisteína se revirtió parcialmente en presencia de L-arginina, como también han descrito Caldwell y colaboradores<sup>270</sup>. Además, la homocisteína inhibe la enzima DDAH, molécula sintetizada durante las modificaciones postraduccionales que inhibe de forma competitiva la NOSe<sup>271</sup>. Todos estos mecanismos reducen la disponibilidad de NO, clave para mantener la función

vascular. Se intentó determinar mediante Wester-blotting la expresión de la NOSe y la NOSe activada, pero no se logró detectar. La XO también parece contribuir a la disfunción endotelial por homocisteína, pues el alopurinol recuperó ligeramente la respuesta a la ACh.

La homocisteína también tiene un efecto proinflamatorio directo o como consecuencia del exceso de ERO. Se activa el factor NF-kB, que estimula la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión como IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1, y E-Selectin<sup>272</sup>. Estos factores contribuyen a la activación endotelial, al reclutamiento de células inflamatorias y al desarrollo de aterosclerosis. La homocisteína o su derivado, la homocisteína tiolactona, puede reaccionar con grupos amino de residuos de lisina, alterando la estructura y funcionalidad de las proteínas<sup>273</sup>. La S-adenosilhomocisteína se hidroliza rápidamente a adenosina y homocisteína, que es eliminada por las rutas de transulfuración y remetilación. Sin embargo, el exceso de homocisteína desplaza el equilibrio hacia la formación de S-adenosilmetionina, que inhibe las reacciones de metilación, necesarias para el correcto funcionamiento celular. La hipometilación afecta, entre otros procesos, a la regulación de la expresión génica. Estos cambios epigenéticos pueden tener una repercusión importante y son necesarios estudios adicionales<sup>274</sup>.

La apoptosis de células endoteliales también parece contribuir al daño vascular de la homocisteína. Zhan y colaboradores observaron un aumento de los factores proapoptóticos en células endoteliales tratadas con homocisteína<sup>275</sup>. En este sentido, la apoptosis fue una de las opciones para explicar la disminución de la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  obtenida en los anillos previamente incubados con homocisteína. Sin embargo, la reducción de la señal de luminiscencia se mantiene en anillos sin endotelio, por lo que tendría que ser otra la explicación o quizás, el músculo liso también quede afectado aunque no repercuta de forma significativa en la funcionalidad.

La pérdida de relajación que produce homocisteína puede utilizarse para valorar la actividad antioxidante. Algunos compuestos que han logrado disminuir la alteración en la respuesta a la ACh son el salidrósido<sup>258</sup>, el astragalósido<sup>276</sup>, la curcumina<sup>277</sup> o la alamandina<sup>278</sup>. La incubación con astaxantina o licopeno a la dosis que se venía utilizando en los estudios de funcionalidad vascular (10  $\mu\text{M}$ ) no modificó el efecto de la homocisteína. Dado que para hacer las curvas concentración-respuesta a la ACh se renueva la solución nutritiva, en este caso, se evaluó una dosis superior de astaxantina (100  $\mu\text{m}$ ) que, para nuestra sorpresa, empeoró la respuesta.

Esta concentración también redujo la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  en mayor medida que los anillos incubados solo con homocisteína. Estos resultados nos llevaron a estudiar concentraciones más bajas de ambos carotenoides (1  $\mu\text{M}$ ), que dieron lugar a una leve mejoría de la relajación. Se ha descrito para algunos antioxidantes un efecto prooxidante a concentraciones altas, que podría explicar este comportamiento<sup>279</sup>. No obstante, esa mejoría no se mantuvo con dosis inferiores (0,1  $\mu\text{M}$ ). El efecto de la astaxantina y del licopeno es más bien discreto. Existen varios estudios que avalan el potencial terapéutico de la astaxantina y del licopeno en el contexto de hiperhomocisteinemia. Fan y colaboradores reportaron que la astaxantina era capaz de prevenir la cardiotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* inducida por la homocisteína<sup>280</sup>. Asimismo, Wang y su equipo encontraron que la astaxantina mejoraba la disfunción endotelial producida por la homocisteína mediante la supresión de la vía de señalización del VEGF<sup>281</sup>. Por su parte, el licopeno (27 mg/día) logró reducir los niveles de homocisteína en pacientes con infarto de miocardio<sup>282</sup>. Al igual que en los modelos de disfunción vascular previos, la quercetina revirtió la pérdida de relajación a la ACh y la disminución de la producción de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ , lo que refuerza el papel protagonista del estrés oxidativo en la disfunción endotelial causada por la homocisteína.

Quisiera terminar esta discusión con una pequeña reflexión. A lo largo de este trabajo hemos podido apreciar que el potencial efecto beneficioso de la astaxantina y del licopeno no se ha puesto de manifiesto en la mayoría de los estudios realizados. Cuando nos planteamos iniciar este trabajo lo hacíamos apoyados en los resultados obtenidos por nuestro grupo con la astaxantina y el licopeno en ratas y la extensa bibliografía revisada. Los resultados obtenidos distan mucho de la hipótesis inicial. Si bien unos resultados diferentes a los previstos pueden descolocar y afectar el ánimo del investigador, obligan a hacer un esfuerzo mayor para buscar una explicación. En muchas ocasiones, no llegaremos a encontrar la razón que explique nuestros hallazgos y son muchos los caminos que se pueden seguir para continuar avanzando y arrojar luz. En este sentido, es necesario hacer un esfuerzo colectivo para incentivar la difusión de los mal llamados resultados negativos. Es la única forma de conseguir que la ciencia avance y sea de calidad.



## **CONCLUSIONES**



1. La astaxantina y el licopeno previenen el desarrollo del síndrome metabólico inducido en ratas Wistar mediante el aporte de fructosa en el agua de bebida, al impedir el aumento de la presión arterial, mejorar la intolerancia a la glucosa y, en el caso del licopeno, reducir la dislipemia.
2. En ratones desarrollamos el síndrome metabólico mediante dos dietas diferentes enriquecidas en fructosa y grasa, una diseñada íntegramente por nosotros y otra utilizando el pienso comercial. Con ambas se obtienen tres de las cuatro alteraciones principales que definen el síndrome metabólico: obesidad abdominal, alteraciones en el metabolismo de la glucosa y dislipemia, sin incremento de la presión arterial, otra característica clave del síndrome metabólico. El peso corporal, la glucemia en ayunas y los niveles plasmáticos de triglicéridos son parámetros que también se alteran en el segundo modelo.
3. La astaxantina y el licopeno apenas muestran actividad ni en la prevención ni en el tratamiento del síndrome metabólico inducido en ratones mediante una dieta rica en fructosa y en grasa.
4. En los estudios de funcionalidad vascular se observa una marcada reducción de las respuestas contracturantes mediadas por receptor en anillos de aorta procedentes de ratones con síndrome metabólico que apenas se vio modificada por la astaxantina y el licopeno.
5. La astaxantina y el licopeno no son capaces de prevenir la disfunción endotelial debida al exceso de radicales superóxido generados por el pirogalol o por el sistema xantina/xantina oxidasa.
6. La disfunción vascular en anillos de aorta inducida por la homocisteína mediante un mecanismo complejo, en el que tiene un papel protagonista el estrés oxidativo, tan solo se mejora ligeramente con concentraciones bajas de ambos carotenoides.
7. La astaxantina y el licopeno no presentan actividad *scavenger* en ensayos *in vitro*. El efecto observado sobre los radicales superóxido producidos en la reacción catalizada por xantina oxidasa, podría deberse a una inhibición de la actividad de esta enzima.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Oda, E. Metabolic syndrome: its history, mechanisms, and limitations. *Acta Diabetol.* **49**, 89–95 (2012).
2. Reaven, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595–607 (1988).
3. DeFronzo, R. A. & Ferrannini, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14**, 173–94 (1991).
4. Alberti, K. G. M. M. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539–553 (1998).
5. Balkau, B. & Charles, M. A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet. Med.* **16**, 442–3 (1999).
6. National Cholesterol Education Program (US). Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–97 (2001).
7. Bloomgarden, Z. T. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC. *Diabetes Care* **26**, 1297–303 (2003).
8. Grundy, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome. *Circulation* **112**, 2735–2752 (2005).
9. Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International. *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
10. Simmons, R. K. *et al.* The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia* **53**, 600–605 (2010).
11. Saklayen, M. G. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **20**, 12 (2018).
12. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 1–21 (2014).
13. Ahima, R. S. Overview of metabolic syndrome. in *Metabolic Syndrome* (ed. Ahima, R. S.) 1–13 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-12125-3\_1-1
14. Shin, D., Kongpakpaisarn, K. & Bohra, C. Trends in the prevalence of metabolic syndrome and its components in the United States 2007-2014. *Int. J. Cardiol.* **259**, 216–219 (2018).

## Bibliografía

15. Asociación Latinoamericana de Diabetes. *Epidemiología, diagnóstico, control, prevención y tratamiento del síndrome metabólico en adultos*. (2010).
16. Scuteri, A. *et al.* Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **22**, 486–491 (2015).
17. Fernández-Bergés, D. *et al.* Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS. *Rev. Esp. Cardiol.* **65**, 241–248 (2012).
18. Marcuello, C. *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome in Spain using regional cutoff points for waist circumference: the di@bet.es study. *Acta Diabetol.* **50**, 615–623 (2013).
19. Guallar-Castilló, P. *et al.* Magnitud y manejo del síndrome metabólico en España en 2008-2010. Estudio ENRICA. *Rev Esp Cardiol* **67**, 367–373 (2014).
20. World Health Organization. *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. (2014).
21. World Health Organization. *Obesity and overweight*. (2019).
22. Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N. & Lázaro-Masedo, S. Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. *Rev. Española Cardiol.* **69**, 579–587 (2016).
23. Anselmo, M. T., Olinto, H. T. & Canuto, R. Epidemiology of abdominal obesity. in *Adiposity-Epidemiology and Treatment Modalities* (ed. Gordeladge, J.) (2017).
24. Francesco, C. *et al.* ESC/EASD Guidelines on diabetes, pre-diabetes and cardiovascular diseases in collaboration with the EASD. *Eur. Heart J.* **41**, 255–223 (2020).
25. World Health Organization. *Informe mundial sobre la diabetes*. (2016).
26. International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas - 9th edition*. (2019).
27. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas. *XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Diabetes*. (2018).
28. Chan, D. C., Pang, J. & Watts, G. F. Dyslipidemia in obesity. in *Metabolic Syndrome* (ed. Ahima, R. S.) 525–540 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-11251-0\_30
29. Urtaran Laresgoiti, M., Nuño Solinis, R., Pérez de la Isla, L., Mata, P. & Leguina, I. *Hipercolesterolemia: una llamada a la acción. Una revisión integral del impacto de la hipercolesterolemia*. (2017).
30. Wilkins, E. *et al.* *European cardiovascular disease statistics 2017*. (2017).
31. Williams, B. *et al.* Guía ESC/ESH 2018 sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Rev. Española Cardiol.* **72**, 160.e1-160.e78 (2019).
32. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement



- studies with 19·1 million participants. *Lancet* **389**, 37–55 (2017).
33. Banegas, J. & Gijón-Conde, T. Epidemiología de la hipertensión arterial. *Hipertens. y riesgo Vasc.* **34**, 2–4 (2017).
  34. McCracken, E., Monaghan, M. & Sreenivasan, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin. Dermatol.* **36**, 14–20 (2018).
  35. Aydin, S. *et al.* Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* **30**, 1–9 (2014).
  36. Weiss, M., Steiner, D. F. & Philipson, L. H. *Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships.* Endotext (MDText.com, Inc., 2000).
  37. Lizcano, J. M. & Alessi, D. R. The insulin signalling pathway. *Curr. Biol.* **12**, R236–8 (2002).
  38. Mackenzie, R. W. & Elliott, B. T. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes.* **7**, 55–64 (2014).
  39. Boura-Halfon, S. & Zick, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Metab.* **296**, E581–E591 (2009).
  40. Bryant, N. J., Govers, R. & James, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 267–277 (2002).
  41. Savage, D. B., Petersen, K. F. & Shulman, G. I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol. Rev.* **87**, 507–520 (2007).
  42. Dentin, R. *et al.* Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* **449**, 366–369 (2007).
  43. Goldberg, I. J., Eckel, R. H. & Abumrad, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S86–90 (2009).
  44. Mansbach, C. M. & Siddiqi, S. A. The biogenesis of chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 315–33 (2010).
  45. Nelson, David L., C. M. M. Catabolismo de los ácidos grasos. in *Lehninger: Principios de bioquímica* (ed. Omega) 647–652 (2018).
  46. Julve, J., Martín-Campos, J. M., Escolà-Gil, J. C. & Blanco-Vaca, F. Chylomicrons: advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin. Chim. Acta* **455**, 134–148 (2016).
  47. Laso FJ. Patología del metabolismo de los lípidos. in *Introducción a la medicina clínica. Fisiopatología y semiología* (ed. Laso, F. J.) 411–416 (2010).
  48. Nakajima, K. *et al.* Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin. Chim. Acta* **412**, 1306–1318 (2011).
  49. Schaefer, E. J., Anthanont, P. & Asztalos, B. F. High-density lipoprotein metabolism, composition, function, and deficiency. *Curr. Opin. Lipidol.* **25**, 194–9 (2014).

## Bibliografía

50. Zhou, L., Li, C., Gao, L. & Wang, A. High-density lipoprotein synthesis and metabolism. *Mol. Med. Rep.* **12**, 4015–4021 (2015).
51. Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna Jesús Alberto Olivares-Reyes, A. & Alberto Olivares-Reyes, J. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. *Gac. Med. Mex.* **153**, 214–228 (2017).
52. Copps, K. D. & White, M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* **55**, 2565–2582 (2012).
53. Peirce, V., Pellegrinelli, V. & Vidal-Puig, A. Adipose Structure (white, brown, beige). in *Metabolic Syndrome* (ed. Ahima, R. S.) 369–396 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-11251-0\_23
54. Unger, R. H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes* **44**, 863–870 (1995).
55. Wagner, A. *et al.* Sedentary behaviour, physical activity and dietary patterns are independently associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* **38**, 428–435 (2012).
56. Stančáková, A. & Laakso, M. Genetics of metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**, 243–252 (2014).
57. Bener, A., Darwish, S., Al-Hamaq, A. A., Yousafzai, M. & Nasralla, E. The potential impact of family history of metabolic syndrome and risk of type 2 diabetes mellitus: in a highly endogamous population. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **18**, 202 (2014).
58. Ikram, U. Z. *et al.* Perceived ethnic discrimination and the metabolic syndrome in ethnic minority groups. *Psychosom. Med.* **79**, 101–111 (2017).
59. Veronica, G. & Esther, R.-R. M. Aging, metabolic syndrome and the heart. *Aging Dis.* **3**, 269–79 (2012).
60. Lopez-Huertas, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol. Res.* **61**, 200–207 (2010).
61. Centers for Disease Control and Prevention. Trends in intake of energy and macronutrients - United States, 1971-2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (2004). Available at: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5304a3.htm>. (Accessed: 11th February 2020)
62. Liu, A. G. *et al.* A healthy approach to dietary fats: understanding the science and taking action to reduce consumer confusion. *Nutr. J.* **16**, 53 (2017).
63. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Recomendaciones del consumo de azúcares. Reformulación y reducción de azúcares añadidos. Available at: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/ampliacion/reduccion\\_azucares\\_anadidos.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/ampliacion/reduccion_azucares_anadidos.htm). (Accessed: 11th February 2020)

64. World Health Organization. *Information note about intake of sugars recommended in the WHO guideline for adults and children.* (2015).
65. Pereira, R. M. *et al.* Fructose consumption in the development of obesity and the effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. *Nutrients* **9**, 405 (2017).
66. Johnson, R. J. *et al.* Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease<sup>1-3</sup>. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 899–906 (2007).
67. Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A. & Ima-Nirwana, S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr. Metab.* **13**, 1–12 (2016).
68. Steenson, S., Umpleby, A. M., Lovegrove, J. A., Jackson, K. G. & Fielding, B. A. Role of the enterocyte in fructose-induced hypertriglyceridaemia. *Nutrients* **9**, 349 (2017).
69. Mayes, P. A. Intermediary metabolism of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 754S–765S (1993).
70. Tappy, L. & Le, K. A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol. Rev.* **90**, 23–46 (2010).
71. Softic, S., Cohen, D. E. & Kahn, C. R. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 1282–1293 (2016).
72. Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M. & Lustig, R. H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 251–264 (2010).
73. Miller, A. & Adeli, K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **24**, 204–209 (2008).
74. Caliceti, C., Calabria, D., Roda, A. & Cicero, A. F. G. Fructose intake, serum uric acid, and cardiometabolic disorders: a critical review. *Nutrients* **9**, 395 (2017).
75. Dong, X. C. *et al.* Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab.* **8**, 65–76 (2008).
76. Lindqvist, A., Baelemans, A. & Erlanson-Albertsson, C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul. Pept.* **150**, 26–32 (2008).
77. Lustig, R. H. Childhood obesity: Behavioral aberration or biochemical drive? Reinterpreting the First Law of Thermodynamics. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2**, 447–458 (2006).
78. Dills, W. L. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 779S–787S (1993).
79. Nagai, R. *et al.* Hydroxyl radical mediates N(ε)-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 167–172 (1997).

## Bibliografía

80. McArdle, M. A., Finucane, O. M., Connaughton, R. M., McMorrow, A. M. & Roche, H. M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 52 (2013).
81. Duarte, J. A. G. *et al.* A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. *J. Lipid Res.* **55**, 2541–2553 (2014).
82. Ferramosca, A., Conte, A., Damiano, F., Siculella, L. & Zara, V. Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diets on hepatic lipogenesis in rats. *Eur. J. Nutr.* **53**, 1103–1114 (2014).
83. Crescenzo, R. *et al.* Polyunsaturated fatty acids stimulate de novo lipogenesis and improve glucose homeostasis during refeeding with high fat diet. *Front. Physiol.* **8**, 178 (2017).
84. Han, M. S. *et al.* JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science (80- )*. **339**, 218–222 (2013).
85. Cnop, M. High fat feeding exacerbates endoplasmic reticulum stress and beta cell demise. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114**, 229–232 (2012).
86. Hariri, N. & Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 270–299 (2010).
87. World Health Organization. World Health Statistics 2018: monitoring health for the SDGs. *WHO* (2018).
88. Instituto Nacional de Estadística. *Defunciones según la causa de muerte*. (2019).
89. Eurostat. Cardiovascular diseases statistics. *Eurostat* (2017). Available at: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cardiovascular\\_diseases\\_statistics#Deaths\\_from\\_cardiovascular\\_diseases](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cardiovascular_diseases_statistics#Deaths_from_cardiovascular_diseases). (Accessed: 6th May 2019)
90. Medrano, M. J., Cerrato, E., Boix, R. & Delgado-Rodríguez, M. Cardiovascular risk factors in Spanish population: metaanalysis of cross-sectional studies. *Med. Clin. (Barc)*. **124**, 606–612 (2005).
91. Aboonabi, A., Meyer, R. R. & Singh, I. The association between metabolic syndrome components and the development of atherosclerosis. *J. Hum. Hypertens.* **33**, 844–855 (2019).
92. Libby, P. *et al.* Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 1–18 (2019).
93. Tune, J. D., Goodwill, A. G., Sassoon, D. J. & Mather, K. J. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl. Res.* **183**, 57–70 (2017).
94. Aller, R. *et al.* Consensus document. Management of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Clinical practice guideline. *Gastroenterol. Hepatol.* **41**, 328–349 (2018).
95. Neuschwander-Tetri, B. A. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med.* **15**, 45 (2017).

96. Carr, R. M., Oranu, A. & Khungar, V. Nonalcoholic fatty liver disease: pathophysiology and management. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **45**, 639–652 (2016).
97. Liguori, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **Volume 13**, 757–772 (2018).
98. Taverne, Y. J. H. J., Bogers, A. J. J. C., Duncker, D. J. & Merkus, D. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 862423 (2013).
99. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
100. Trinei, M. *et al.* p66Shc, mitochondria, and the generation of reactive oxygen species. in *Methods in enzymology* (eds. Abelson, J. N. & Simon, M. I.) **528**, 99–110 (Elsevier Inc., 2013).
101. Bhatti, J. S., Bhatti, G. K. & Reddy, P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 1066–1077 (2017).
102. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
103. Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D. & Batra, S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 5–23 (2015).
104. García-Redondo, A. B., Aguado, A., Briones, A. M. & Salaices, M. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Res.* **114**, 110–120 (2016).
105. Guzik, T. J. & Touyz, R. M. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension* **70**, 660–667 (2017).
106. Montezano, A. C. & Touyz, R. M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 164–182 (2013).
107. Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593 (2001).
108. Rochette, L. *et al.* Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol. Ther.* **140**, 239–57 (2013).
109. Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M. & Bolognesi, A. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: physiological and pathological effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 3527579 (2016).
110. Sugamura, K. & Keane, J. F. jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 978–992 (2011).
111. Ndrepepa, G. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative

- stress with cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta* **493**, 36–51 (2019).
112. Touyz, R. M. & Briones, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens. Res.* **34**, 5–14 (2011).
  113. Incalza, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul. Pharmacol.* **100**, 1–19 (2018).
  114. Siti, H. N., Kamisah, Y. & Kamsiah, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul. Pharmacol.* **71**, 40–56 (2015).
  115. Francisqueti, F. valentini *et al.* The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **63**, 85–91 (2017).
  116. Bonomini, F., Rodella, L. F. & Rezzani, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* **6**, 109 (2015).
  117. Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K. & Yadav, U. C. S. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* **148**, 183–193 (2016).
  118. Abate, G., Delbarba, A., Marziano, M., Memo, M. & Uberti, D. Advanced glycation end products (AGES) in food: focusing on Mediterranean pasta. *J. Nutr. Food Sci.* **05**, 1–7 (2015).
  119. Montezano, A. C. & Touyz, R. M. Molecular mechanisms of hypertension—reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can. J. Cardiol.* **28**, 288–295 (2012).
  120. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* **54**, 287–293 (2018).
  121. Copple, I. M. The Keap1–Nrf2 cell defense pathway – A promising therapeutic target? *Adv. Pharmacol.* **63**, 43–79 (2012).
  122. Zhang, Z. *et al.* The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **16**, 35–45 (2015).
  123. Pérez-Martínez, P. *et al.* Lifestyle recommendations for the prevention and management of metabolic syndrome: an international panel recommendation. *Nutr. Rev.* **75**, 307–326 (2017).
  124. Sirtori, C. R., Pavanello, C., Calabresi, L. & Ruscica, M. Nutraceutical approaches to metabolic syndrome. *Ann. Med.* **49**, 678–697 (2017).
  125. De la Iglesia, R. *et al.* Dietary strategies implicated in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1877 (2016).
  126. Beydoun, M. A. *et al.* Carotenoids, vitamin A, and their association with the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Rev.* **77**, 32–45 (2019).

127. Maoka, T. Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.* **74**, 1–16 (2020).
128. Jackson, H., Braun, C. L. & Ernst, H. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am. J. Cardiol.* **101**, 50D-57D (2008).
129. Riccioni, G. Carotenoids and cardiovascular disease. in *Nutraceuticals and Functional Foods: Natural Remedy* (eds. Kaur Brar, S., Kaur, S. & Dhillon, G. S.) 79–98 (Nova Science Publishers, Inc., 2014). doi:10.1201/9781439822371.ch21
130. IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of carotenoids (rules approved 1974). *Pure Appl. Chem.* **41**, 405–431 (1975).
131. Cordero, B. F., Couso, I., León, R., Rodríguez, H. & Vargas, M. Á. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 341–351 (2011).
132. Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S. & Aswathanarayana, R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Mar. Drugs* **12**, 128–152 (2014).
133. Pashkow, F. J., Watumull, D. G. & Campbell, C. L. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **101**, S58–S68 (2008).
134. Fassett, R. G. & Coombes, J. S. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar. Drugs* **9**, 447–465 (2011).
135. Okada, Y., Ishikura, M. & Maoka, T. Bioavailability of astaxanthin in haematococcus algal extract: the effects of timing of diet and smoking habits. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1928–1932 (2009).
136. Kotake-Nara, E. & Nagao, A. Absorption and metabolism of xanthophylls. *Mar. Drugs* **9**, 1024–1037 (2011).
137. Yang, Y., Kim, B. & Lee, J. Y. *Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits*. *J Hum Nutr Food Sci* **1**, (2013).
138. Kistler, A. *et al.* Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **75**, 665–675 (2002).
139. Choi, H. D., Kang, H. E., Yang, S. H., Lee, M. G. & Shin, W. G. Pharmacokinetics and first-pass metabolism of astaxanthin in rats. *Br. J. Nutr.* **105**, 220–227 (2011).
140. Shi, J. & Le Maguer, M. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **40**, 1–42 (2000).
141. Costa-Rodrigues, J., Pinho, O. & Monteiro, P. R. R. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease? *Food Chem.* **245**, 1148–1153 (2018).

## Bibliografia

142. Petyaev, I. M. Lycopene deficiency in ageing and cardiovascular disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 3218605 (2016).
143. Moise, A. R., Al-Babili, S. & Wurtzel, E. T. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chem. Rev.* **114**, 164–193 (2014).
144. Moussa, M. *et al.* Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *J. Nutr.* **138**, 1432–1436 (2008).
145. Borel, P., Desmarchelier, C., Nowicki, M. & Bott, R. Lycopene bioavailability is associated with a combination of genetic variants. *Free Radic. Biol. Med.* **83**, 238–244 (2015).
146. Moran, N. E. *et al.* Compartmental and noncompartmental modeling of <sup>13</sup>C-lycopene absorption, isomerization, and distribution kinetics in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **102**, 1436–1449 (2015).
147. Mein, J. R., Lian, F. & Wang, X. D. Biological activity of lycopene metabolites: Implications for cancer prevention. *Nutr. Rev.* **66**, 667–683 (2008).
148. Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L. & Jorjani, M. Astaxanthin: a mechanistic review on its biological activities and health benefits. *Pharmacol. Res.* **136**, 1–20 (2018).
149. Müller, L., Caris-Veyrat, C., Lowe, G. & Böhm, V. Lycopene and its antioxidant role in the prevention of cardiovascular diseases. A Critical Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 1868–1879 (2016).
150. Grudzinski, W. *et al.* Localization and orientation of xanthophylls in a lipid bilayer. *Sci. Rep.* **7**, 9619 (2017).
151. Kidd, P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Altern. Med. Rev.* **16**, 355–64 (2011).
152. McNulty, H., Jacob, R. F. & Mason, R. P. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am. J. Cardiol.* **101**, S20–S29 (2008).
153. Goto, S. *et al.* Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1512**, 251–258 (2001).
154. Li, Z. *et al.* Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Mol. Vis.* **19**, 1656–66 (2013).
155. Inoue, Y. *et al.* Astaxanthin analogs, adonixanthin and lycopene, activate Nrf2 to prevent light-induced photoreceptor degeneration. *J. Pharmacol. Sci.* **134**, 147–157 (2017).
156. Ciccone, M. M. *et al.* Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care. *Mediators Inflamm.* **2013**, 782137 (2013).



157. Jomova, K. & Valko, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* **70**, 102–110 (2013).
158. Mozos, I. *et al.* Lycopene and vascular health. *Front. Pharmacol.* **9**, 521 (2018).
159. Lee, S.-J. *et al.* Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol. Cells* **16**, 97–105 (2003).
160. Assar, E. A., Castellano Vidalle, M., Chopra, M. & Hafizi, S. Lycopene acts through inhibition of I(kappa)B kinase to suppress NF-kB signaling in human prostate and breast cancer cells. *Tumor Biol.* **37**, 9375–9385 (2016).
161. Choi, S.-K., Park, Y.-S., Choi, D.-K. & Chang, H.-I. Effects of astaxanthin on the production of NO and the expression of COX-2 and iNOS in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1990–6 (2008).
162. Thies, F., Mills, L. M., Moir, S. & Masson, L. F. Cardiovascular benefits of lycopene: fantasy or reality? *Proc. Nutr. Soc.* **76**, 122–129 (2017).
163. Kavitha, K., Kowshik, J., Kishore, T. K. K., Baba, A. B. & Nagini, S. Astaxanthin inhibits NF-κB and Wnt/β-catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 4433–4444 (2013).
164. Jeong, Y. *et al.* Lycopene inhibits reactive oxygen species-mediated NF-κB signaling and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Nutrients* **11**, 762 (2019).
165. Dong, L.-Y., Jin, J., Lu, G. & Kang, X.-L. Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress. *Mar. Drugs* **11**, 960–74 (2013).
166. HE, Q., ZHOU, W., XIONG, C., TAN, G. & CHEN, M. Lycopene attenuates inflammation and apoptosis in post-myocardial infarction remodeling by inhibiting the nuclear factor-κB signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **11**, 374–378 (2015).
167. Ekpe, L., Inaku, K., Ekpe, V. & Lawson Ekpe, C. Antioxidant effects of astaxanthin in various diseases. A review. *J. Mol. Pathophysiol.* **7**, 1–6 (2018).
168. Choi, H. D., Kim, J. H., Chang, M. J., Kyu-Youn, Y. & Shin, W. G. Effects of astaxanthin on oxidative stress in overweight and obese adults. *Phyther. Res.* **25**, 1813–1818 (2011).
169. Choi, H. D., Youn, Y. K. & Shin, W. G. Positive effects of astaxanthin on lipid profiles and oxidative stress in overweight subjects. *Plant Foods Hum. Nutr.* **66**, 363–369 (2011).
170. Riccioni, G. *et al.* Relationship between plasma antioxidant concentrations and carotid intima-media thickness: the asymptomatic carotid atherosclerotic disease in Manfredonia study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **16**, 351–357 (2009).

## Bibliografía

171. Cheng, H. M. *et al.* Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* **257**, 100–108 (2017).
172. Zou, Z.-Y. *et al.* Effects of lutein and lycopene on carotid intima–media thickness in Chinese subjects with subclinical atherosclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br. J. Nutr.* **111**, 474–480 (2014).
173. Song, B. *et al.* Lycopene and risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of observational studies. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1601009 (2017).
174. Zou, J., Feng, D., Ling, W.-H. & Duan, R.-D. Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 1117–1122 (2013).
175. Mills, L. M., Wilson, H. & Thies, F. Lycopene inhibits lymphocyte proliferation through mechanisms dependent on early cell activation. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 1034–1042 (2012).
176. Biddle, M. J. *et al.* Lycopene dietary intervention. *J. Cardiovasc. Nurs.* **30**, 205–212 (2015).
177. Burton-Freeman, B. M. & Sesso, H. D. Whole food versus supplement: comparing the clinical evidence of tomato intake and lycopene supplementation on cardiovascular risk factors. *Adv. Nutr.* **5**, 457–85 (2014).
178. Li, X. & Xu, J. Dietary and circulating lycopene and stroke risk: a meta-analysis of prospective studies. *Sci. Rep.* **4**, 5031 (2014).
179. Pelucchi, C. *et al.* Dietary intake of carotenoids and retinol and endometrial cancer risk in an Italian case–control study. *Cancer Causes Control* **19**, 1209–1215 (2008).
180. Monroy-Ruiz, J., Sevilla, M.-Á., Carrón, R. & Montero, M.-J. Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res.* **63**, 44–50 (2011).
181. Santos, P. *et al.* Dietary intake of lycopene decreases the cardiovascular risk in spontaneously hipertensive rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **115**, 28–28 (2014).
182. Ferreira-Santos, P. *et al.* Lycopene-supplemented diet ameliorates cardiovascular remodeling and oxidative stress in rats with hypertension induced by Angiotensin II. *J. Funct. Foods* **47**, 279–287 (2018).
183. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.* **107**, 1340–1348 (1977).
184. Al-Magableh, M. R., Kemp-Harper, B. K., Ng, H. H., Miller, A. A. & Hart, J. L. Hydrogen sulfide protects endothelial nitric oxide function under conditions of acute oxidative stress in vitro. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **387**, 67–74 (2014).

185. Fowler, B. Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology and role in disease processes. *Semin. Vasc. Med.* **5**, 77–86 (2005).
186. Lai, W. K. C. & Kan, M. Y. Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann. Nutr. Metab.* **67**, 1–12 (2015).
187. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
188. Apak, R. *et al.* Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **85**, 957–998 (2013).
189. Ayuda-Durán, B. *et al.* Antioxidant characterization and biological effects of grape pomace extracts supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods* **8**, 75 (2019).
190. Nolan, P. B., Carrick-Ranson, G., Stinear, J. W., Reading, S. A. & Dalleck, L. C. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: a pooled analysis. *Prev. Med. Reports* **7**, 211–215 (2017).
191. Gregório, B. M., De Souza, D. B., de Morais Nascimento, F. A., Pereira, L. M. & Fernandes-Santos, C. The potential role of antioxidants in metabolic syndrome. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 859–869 (2016).
192. Taskinen, M. R., Packard, C. J. & Borén, J. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Nutrients* **11**, 1987 (2019).
193. Johnson, R. J. *et al.* Hypothesis: Could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr. Rev.* **30**, 96–116 (2009).
194. Stanhope, K. L. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **53**, 52–67 (2016).
195. Hidayati, L., Widodo, A. D. W. & Hidayat, B. Animal models with metabolic syndrome markers induced by high fat diet and fructose. *Med. Lab. Technol. J.* **6**, (2020).
196. Malakul, W., Pengnet, S., Kumchoom, C. & Tunsophon, S. Naringin ameliorates endothelial dysfunction in fructose-fed rats. *Exp. Ther. Med.* **15**, 3140–3146 (2018).
197. Moreno-Fernández, S. *et al.* High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients* **10**, 1502 (2018).
198. Thirunavukkarasu, V., Anitha Nandhini, A. T. & Anuradha, C. V. Lipoic acid attenuates hypertension and improves insulin sensitivity, kallikrein activity and nitrite levels in high fructose-fed rats. *J. Comp. Physiol. B* **174**, 587–592 (2004).
199. Sánchez-Lozada, L. G. *et al.* Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **292**, F423-9 (2007).
200. Shahraki, M. R., Harati, M. & Shahraki, A. R. Prevention of high fructose-induced metabolic syndrome in male wistar rats by aqueous extract of

- Tamarindus indica seed. *Acta Med. Iran.* **49**, 277–283 (2011).
201. Oron-Herman, M. *et al.* Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am. J. Hypertens.* **21**, 1018–1022 (2008).
  202. Dupas, J. *et al.* Metabolic syndrome and hypertension resulting from fructose enriched diet in Wistar rats. *Biomed Res. Int.* **2017**, 2494067 (2017).
  203. Mahmoud., A. A. A. & Elshazly, S. M. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One* **9**, e106993 (2014).
  204. Mansour, S. M., Zaki, H. F. & El-Denshary, E.-E.-D. S. Beneficial effects of co-enzyme Q10 and rosiglitazone in fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* **51**, 13–21 (2013).
  205. Mamikutty, N. *et al.* The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res. Int.* **2014**, 263897 (2014).
  206. Di Luccia, B. *et al.* Rescue of fructose-induced metabolic syndrome by antibiotics or faecal transplantation in a rat model of obesity. *PLoS One* **10**, e0134893 (2015).
  207. Jürgens, H. *et al.* Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes. Res.* **13**, 1145–1156 (2005).
  208. Klein, A. V. & Kiat, H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. *J. Hypertens.* **33**, 912–920 (2015).
  209. Nordestgaard, B. G. & Varbo, A. Triglycerides and cardiovascular disease. *The Lancet* **384**, 626–635 (2014).
  210. Peters, S. A. E., Singhateh, Y., Mackay, D., Huxley, R. R. & Woodward, M. Total cholesterol as a risk factor for coronary heart disease and stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* **248**, 123–131 (2016).
  211. Mach, F. *et al.* 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* **41**, 111–188 (2020).
  212. Kim, J. Y. *et al.* Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Atherosclerosis* **215**, 189–195 (2011).
  213. Paran, E., Novack, V., Engelhard, Y. N. & Hazan-Halevy, I. The effects of natural antioxidants from tomato extract in treated but uncontrolled hypertensive patients. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **23**, 145–151 (2009).
  214. Ried, K. & Fakler, P. Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: meta-analyses of intervention trials. *Maturitas* **68**, 299–310 (2011).
  215. Hozawa, A. *et al.* Circulating carotenoid concentrations and incident hypertension: the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *J. Hypertens.* **27**, 237–242 (2009).

216. Zeng, J. *et al.* Lycopene protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating oxidative stress. *J. Nutr. Biochem.* **66**, 70–78 (2019).
217. Hussein, G. *et al.* Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 47–52 (2005).
218. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.* **107**, 1340–1348 (1977).
219. Fraulob, J. C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M. B. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. A mouse model of metabolic syndrome: Insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **46**, 212–223 (2010).
220. Gallou-Kabani, C. *et al.* C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity* **15**, 1996–2005 (2007).
221. Poudyal, H., Panchal, S. & Brown, L. Comparison of purple carrot juice and  $\beta$ -carotene in a high-carbohydrate, high-fat diet-fed rat model of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* **104**, 1322–1332 (2010).
222. Senaphan, K. *et al.* Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet. *Nutrients* **7**, 6446–6464 (2015).
223. World Health Organization. Healthy diet. (2020). Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>. (Accessed: 14th March 2020)
224. Zhang, J. *et al.* Structurally different flavonoid subclasses attenuate high-fat and high-fructose diet induced metabolic syndrome in rats. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 12412–12420 (2018).
225. Yang, Z.-H., Miyahara, H., Takeo, J. & Katayama, M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol. Metab. Syndr.* **4**, 32 (2012).
226. Nickelson, K. J. *et al.* A comparison of inflammatory and oxidative stress markers in adipose tissue from weight-matched obese male and female mice. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 859395 (2012).
227. Della Vedova, M. C. *et al.* A mouse model of diet-induced obesity resembling most features of human metabolic syndrome. *Nutr. Metab. Insights* **9**, 93–102 (2016).
228. Hao, L. *et al.* Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Food Nutr. Res.* **59**, 28886 (2015).
229. Dissard, R. *et al.* Long term metabolic syndrome induced by a high fat high fructose diet leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice. *PLoS One* **8**, e76703 (2013).
230. Touyz, R. M. *et al.* Oxidative stress – A unifying paradigm in hypertension. *Can.*

## Bibliografia

- J. Cardiol.* **36**, 659–670 (2020).
231. Kobayasi, R. *et al.* Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J. Hypertens.* **28**, 2111–2119 (2010).
  232. Soares, A. G., Carvalho, M. H. C. De & Akamine, E. Obesity induces artery-specific alterations: evaluation of vascular function and inflammatory and smooth muscle phenotypic markers. *Biomed Res. Int.* **2017**, 5038602 (2017).
  233. Ghatta, S., Srinivasan, K., Kaul, C. L. & Ramarao, P. A study on alpha-adrenoceptor mediated contractile responses of high fat diet fed rat thoracic aorta. *Pharmazie* **60**, 142–6 (2005).
  234. Liu, L. *et al.* Protein kinase C $\delta$  contributes to phenylephrine-mediated contraction in the aortae of high fat diet-induced obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 1179–1183 (2014).
  235. Ferreira-Santos, P., Aparicio, R., Carrón, R., Montero, M. J. & Sevilla, M. Á. Lycopene-supplemented diet ameliorates metabolic syndrome induced by fructose in rats. *J. Funct. Foods* **73**, 104098 (2020).
  236. Yin, Q. *et al.* Lycopene attenuates insulin signaling deficits, oxidative stress, neuroinflammation, and cognitive impairment in fructose-drinking insulin resistant rats. *Neuropharmacology* **86**, 389–396 (2014).
  237. Chen, G. *et al.* Lycopene alleviates obesity-induced inflammation and insulin resistance by regulating M1/M2 status of macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* **63**, 1900602 (2019).
  238. Hussein, G. *et al.* Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-cp. *Life Sci.* **80**, 522–529 (2007).
  239. Preuss, H. G., Echard, B., Bagchi, D., Perricone, N. V. & Yamashita, E. Astaxanthin lowers blood pressure and lessens the activity of the renin-angiotensin system in Zucker Fatty Rats. *J. Funct. Foods* **1**, 13–22 (2009).
  240. Preuss, H. G., Echard, B., Yamashita, E. & Perricone, N. V. High dose astaxanthin lowers blood pressure and increases insulin sensitivity in rats: are these effects interdependent? *Int. J. Med. Sci.* **8**, 126–138 (2011).
  241. Kim, B. *et al.* Astaxanthin inhibits inflammation and fibrosis in the liver and adipose tissue of mouse models of diet-induced obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr. Biochem.* **43**, 27–35 (2017).
  242. Ni, Y. *et al.* Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: a comparison with Vitamin E. *Sci. Rep.* **5**, 17192 (2015).
  243. Incalza, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul. Pharmacol.* **100**, 1–19 (2018).
  244. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).

245. Ramasarma, T. *et al.* New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. *Mol. Cell. Biochem.* **400**, 277–285 (2014).
246. Förstermann, U. & Münzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**, 1708–1714 (2006).
247. Demirci, B., McKeown, P. P. & Bayraktutan, U. The bimodal regulation of vascular function by superoxide anion: role of endothelium. *J. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 223–229 (2008).
248. Yeh-Siang, L., Subramaniam, G., Hadi, A. H. A., Murugan, D. & Mustafa, M. R. Reactive oxygen species-induced impairment of endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings: protection by methanolic extracts of *Phoebe grandis*. *Molecules* **16**, 2990–3000 (2011).
249. Jin, B. hui *et al.* Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* **616**, 200–205 (2009).
250. Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q. & Cui, Y. L. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* **24**, 1123 (2019).
251. Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chem.* **129**, 139–148 (2011).
252. Régnier, P. *et al.* Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. *Mar. Drugs* **13**, 2857–2874 (2015).
253. Bharadwaj, L. A. & Prasad, K. Mechanism of superoxide anion-induced modulation of vascular tone. *Int. J. Angiol.* **11**, 23–29 (2002).
254. Auch-Schwelk, W., Katusic, Z. S. & Vanhoutte, P. M. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **13**, 859–64 (1989).
255. Liu, C.-C. *et al.* Lycopene supplementation attenuated xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in skeletal muscle tissues of rats after exhaustive exercise. *Br. J. Nutr.* **94**, 595–601 (2005).
256. Dose, J. *et al.* Free radical scavenging and cellular antioxidant properties of astaxanthin. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
257. Esse, R., Barroso, M., Almeida, I. T. De & Castro, R. The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–24 (2019).
258. Leung, S. B., Zhang, H., Lau, C. W., Huang, Y. & Lin, Z. Salidroside improves homocysteine-induced endothelial dysfunction by reducing oxidative stress. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, 679635 (2013).
259. Cipolla, M. J., Williamson, W. K., Nehler, M. L., Taylor, L. M. & Porter, J. M. The effect of elevated homocysteine levels on adrenergic vasoconstriction of human resistance arteries: the role of the endothelium and reactive oxygen

## Bibliografia

- species. *J. Vasc. Surg.* **31**, 751–759 (2000).
260. McCully, K. S. Chemical pathology of homocysteine IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction and inflammation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **39**, 219–232 (2009).
261. Jacobsen, D. W. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress time for a reality check? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1182–1184 (2000).
262. Smulders, Y. M. *et al.* Homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells coincides with nuclear NOX2 and peri-nuclear NOX4 activity. *Cell Biochem Biophys* **67**, 341–352 (2013).
263. Sipkens, J. A. *et al.* Homocysteine affects cardiomyocyte viability: concentration-dependent effects on reversible flip-flop, apoptosis and necrosis. *Apoptosis* **12**, 1407–1418 (2007).
264. Kučera, J. *et al.* Apocynin and diphenyleiodonium induce oxidative stress and modulate PI3K/Akt and MAPK/Erk activity in mouse embryonic stem cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
265. Smith, R. M., Kruzliak, P., Adamcikova, Z. & Zulli, A. Role of Nox inhibitors plumbagin, ML090 and gp91ds-tat peptide on homocysteine thiolactone induced blood vessel dysfunction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **42**, 860–864 (2015).
266. Lang, D. *et al.* Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 422–7 (2000).
267. Chu, S., Mao, X., Wang, L. & Peng, W. Effects of Huang Qi decoction on endothelial dysfunction induced by homocysteine. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2016**, 1–13 (2016).
268. Wu, S. *et al.* The role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction induced by homocysteine thiolactone. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **29**, 252–259 (2015).
269. Kce Topal, G. *et al.* Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1532–1541 (2004).
270. Jin, L., Caldwell, R. B., Li-Masters, T. & Caldwell, R. W. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport. *J. Physiol. Pharmacol.* **58**, 191–206 (2007).
271. Stühlinger, M. C. *et al.* Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* **104**, 2569–2575 (2001).
272. Wang, G., Siow, Y. L. & O, K. Homocysteine stimulates nuclear factor kB activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells: a possible role for protein kinase C. *Biochem. J.* **352 Pt 3**, 817–26 (2000).
273. Jakubowski, H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine



- thiolactone-mediated vascular disease. *J. Physiol. Pharmacol.* **59**, 155–67 (2008).
274. Barroso, M., Handy, D. E. & Castro, R. The link between hyperhomocysteinemia and hypomethylation. *J. Inborn Errors Metab. Screen.* **5**, 232640981769899 (2017).
275. Zhang, Z. *et al.* Homocysteine induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells via mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–13 (2017).
276. Qiu, L.-H., Xie, X.-J. & Zhang, B.-Q. Astragaloside IV improves homocysteine-induced acute phase endothelial dysfunction via antioxidation. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 641–6 (2010).
277. Tep-Areenan, P. & Suksamrarn, A. Curcumin and tetrahydrocurcumin restore the impairment of endothelium-dependent vasorelaxation induced by homocysteine thiolactone in rat aortic rings. *Int. J. Pharmacol.* **8**, 128–133 (2012).
278. Qaradakhi, T. *et al.* Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms. *Cardiovasc. Ther.* **35**, e12306 (2017).
279. Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. Ten misconceptions about antioxidants. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 430–436 (2013).
280. Han, J.-Y. *et al.* Astaxanthin attenuates homocysteine-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo by inhibiting mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Front. Physiol. Front. Physiol.* **8**, 10413389–1041 (2017).
281. Wang, X. J. *et al.* Astaxanthin inhibits homocysteine-induced endothelial cell dysfunction via the regulation of the reactive oxygen species-dependent VEGF-VEGFR2-FAK signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **19**, 4753–4760 (2019).
282. Chauhan, D. A. P. & Shah, D. P. K. Impact of lycopene intervention on serum homocysteine in patients of myocardial infarction. *Int. J. Med. Res. Rev.* **3**, 1327–1332 (2015).



**ANEXO**



## 1. Disoluciones utilizadas

- Solución Krebs. Su composición es la siguiente (mM): NaCl, 118,7; KCl, 4,7; CaCl<sub>2</sub>, 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; MgSO<sub>4</sub>, 1,2; glucosa, 11,1.
- Solución hiperpotásica (KPSS). Su composición es la siguiente (mM): KCl, 123,7; Cl<sub>2</sub>Ca, 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; MgSO<sub>4</sub>, 1,2; glucosa, 11,1.
- Solución ROS. Su composición es la siguiente (mM): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM; EGTA, 1 mM; sacarosa, 150 mM.

Todas las soluciones se preparan con componentes de calidad de análisis (Merck o Panreac) que se disuelven en agua ultrapura (Labconco-Water Pro, P.S.). El pH se ajusta a 7,4 después de gasear con carbógeno.

## 2. Sustancias utilizadas

**Agonistas.** Para los estudios de funcionalidad de vasos sanguíneos se preparan soluciones madre ( $10^{-1}$  M) de los agonistas utilizados que se congelan en alícuotas. Las soluciones usadas en los experimentos se preparan diariamente a partir de éstas. Ver lista de sustancias en la parte inferior de este anexo.

El resto de sustancias utilizadas se preparan diariamente de acuerdo a las necesidades de los experimentos y en las concentraciones mencionadas en el capítulo de metodología. Las sustancias usadas aparecen a continuación:

- **Acetato de sodio trihidrato.** Sigma-Aldrich
- **Ácido acético.** Sigma-Aldrich
- **Ácido bis(2-aminoetil) etilenglicol-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA).** Sigma-Aldrich.
- **Ácido clorhídrico.** VWR.
- **Alcohol etílico.** VWR
- **Alopurinol.** Sigma-Aldrich
- **Astaxantina.** Sigma-Aldrich
- **Cloruro de fenilefrina.** Sigma-Aldrich
- **Cloruro de acetilcolina.** Sigma-Aldrich
- **Cloruro potásico.** Merck
- **Complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ).** Sigma-Aldrich
- **2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).** Sigma-Aldrich
- **Dimetilsulfóxido (DMSO).** VWR
- **Dinitrato de N,N'-dimetil 9,9'biacridinio (lucigenina).** Sigma-Aldrich
- **Formaldehído en solución 4%.** Merck
- **Heparina sódica.** Panreac
- **4,5-dihidroxi-1,3-benceno ácido sulfónico (tirón).** Sigma-Aldrich
- **4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (apocinina).** Sigma-Aldrich
- **Hidróxido sódico (NaOH).** VWR

- **Licopeno.** BOC Sciences (EEUU)
- **Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).** Sigma-Aldrich
- **Nitroprusiato sódico dihidratado.** Sigma-Aldrich
- **Pentobarbital sódico.** Sigma-Aldrich
- **Quercetina.** Sigma-Aldrich
- **Serotonina.** Sigma Aldrich
- **Superóxido dismutasa (SOD).** Sigma-Aldrich
- **Superóxido dismutasa.** Sigma-Aldrich
- **Tricloruro de hierro.** Sigma-Aldrich
- **Xantina.** Sigma-Aldrich
- **Xantina oxidasa.** Sigma-Aldrich







